

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR
JUDITH NOEL LEZUTEKONG

EFFET DE LA LEPTOMYCINE B SUR LA TRANSLOCATION DU RÉCEPTEUR
NUCLÉAIRE NUR77 ET SUR LA NEUROPROTECTION

JANVIER 2012

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Je m'étais promis de terminer ce manuscrit par ces quelques lignes qui, paradoxalement, seront les premières à être lues. Cette dernière page marque pour moi la fin de ma maîtrise en biophysique et biologie cellulaire. On a rarement l'occasion de remercier individuellement toutes les personnes que nous apprécions et qui nous aident à leur manière à avancer. Cela se limite trop souvent à un timide « merci! » et c'est pourquoi je profite de cette page qui m'est offerte pour le faire vraiment.

Pour commencer, je tiens à remercier très chaleureusement ma directrice de maîtrise, la professeure Maria-Grazia Martinoli, qui m'a donné l'opportunité de faire mes études du deuxième cycle en m'acceptant dans son laboratoire. Je vous remercie pour tout le temps et l'aide que vous m'avez consacrés, pour tous vos conseils et enfin pour la confiance que vous avez eue en moi pendant toute cette période. Je remercie également les professeurs Claude Rouillard et Daniel Lévesque pour avoir élaboré ce projet et pour leur support durant cette aventure dans le monde de la recherche.

Du côté laboratoire, il y a beaucoup de personnes auxquelles je pense, et qui feront de ces quelques années un très bon souvenir. Un merci à Fanny Longpré, Julie Bournival, Cindy Provencher, Justine Renaud, Julie Carange et Joshua Cloutier-Beaupré pour les beaux moments passés au laboratoire sans oublier nos discussions sur l'apoptose et pour votre aide en informatique. Un merci particulier à Catarina Leote Franco Pio pour toute sa disponibilité et surtout parce qu'elle m'a toujours donnée, toutes les informations nécessaires. Je remercie également mes parents qui m'ont toujours soutenue et encouragée pendant mes études et ont souvent fait des sacrifices pour me venir en aide. Enfin un gros merci à Raphaël Lezutekong pour tout son amour, son soutien, son support et ses encouragements pendant mes études. Merci aussi à Ranol et Mori Lezutekong pour tous les beaux moments qu'ils me donnent chaque jour. Je vous aime tous les trois et grâce à vous ma vie est rose tous les jours.

RÉSUMÉ

La maladie de Parkinson est un syndrome moteur très invalidant pour les patients, qui sont généralement âgés de plus de 50 ans. La maladie de Parkinson est caractérisée par la dégénérescence spécifique d'une partie du système nerveux central : les neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta (*locus niger*). La disparition des neurones produisant la dopamine, un neurotransmetteur essentiel dans le contrôle des mouvements, entraîne une akinésie, une perte progressive des capacités motrices et l'apparition des mouvements incontrôlés chez les patients. Cette dégénérescence neuronale est associée à la présence d'inclusions cytoplasmiques, les corps de Lewy, que l'on retrouve typiquement dans la substance noire ainsi que dans le *locus coeruleus*. De par son évolution lente, la MP reste asymptomatique durant plusieurs années. Lorsque les premiers symptômes moteurs apparaissent, le traitement généralement utilisé est la L-Dopa, qui permet aux malades de vivre presque normalement. Ce traitement devient inefficace lors de la phase tardive. Il existe actuellement d'autres thérapies, cependant, tous les traitements utilisés ne sont pour l'instant que des traitements symptomatiques. En l'absence de traitement curatif, il est essentiel de chercher à comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui conduisent à la dégénérescence des neurones dopaminergiques. L'étude du récepteur nucléaire orphelin Nur77 est une approche intéressante parce qu'il est codé par un gène facilement inductible avec une grande influence sur la croissance, la différenciation et l'apoptose cellulaire. Des études antérieures de notre laboratoire ont démontré que sous l'effet de la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) et du 1-méthyle-4-phényl pyridinium (MPP+) Nur77 transloquait du noyau au cytoplasme. De plus, certaines études faites sur des cellules cancéreuses ont démontré que sa translocation du noyau au cytoplasme entraînait l'apoptose, sous l'action d'agent chimiothérapeutique. Le but principal de ce projet était de confirmer la translocation de Nur77 du noyau au cytoplasme après un traitement avec la 6-OHDA, et surtout, de démontrer si la lempptomycine B, ce puissant antifongique était capable de bloquer cette translocation. Dans la seconde partie du projet, notre objectif était d'étudier la modulation de quelques facteurs apoptotiques.

Les résultats obtenus ont confirmé que la 6-OHDA induisait la translocation de Nur77 du noyau au cytoplasme ensuite, ont démontré que la LMB était capable de bloquer cette translocation et de moduler la production de certaines protéines apoptotiques. En conclusion, ces résultats suggèrent que la LMB pourrait être associée à d'autres traitements pour retarder l'évolution de la maladie de Parkinson.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES FIGURES ET TABLEAU.....	viii
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	xi
 CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 La maladie de Parkinson.....	1
1.1.1 Bref historique de la maladie de Parkinson	1
1.1.2 Épidémiologie.....	2
1.1.3 Symptômes cliniques de la MP.....	2
1.1.3.1 Symptômes moteurs.....	3
1.1.3.1.1 Tremblement au repos.....	3
1.1.3.1.2 Rigidité musculaire	3
1.1.3.1.3 Akinésie.....	4
1.1.3.2 Symptômes non moteurs	4
1.1.3.2.1 Les troubles sensitifs.....	4
1.1.3.3 Les troubles psychiques.....	5
1.1.3.3.1 Les troubles de l’affectivité.....	5
1.1.3.3.2 Les troubles du sommeil	6
1.2 Neuropathologie	6
1.2.1 Caractéristiques.....	6
1.2.2 Perte de la pigmentation	7
1.2.3 Les corps de Lewy (CL)	8
1.3 L’étiologie de la maladie de Parkinson	9
1.3.1 Facteurs environnementaux	10
1.3.2 Facteurs génétiques.....	11
1.3.2.1 PARK1 : α -synucleïne.....	11
1.3.2.2 PARK 2 : la parkine.....	12
1.3.2.3 PARK 5 : ubiquitine C-terminalhydrolase L1 (UCH-L1)	12

1.3.2.4	PARK 6 : PINK-1	12
1.3.2.5	PARK 7 : la DJ-1	13
1.3.2.6	PARK 8 : la dardarine.....	13
1.4	Traitements de la maladie de Parkinson	14
1.4.1	Traitements pharmacologiques	14
1.4.2	Traitements chirurgicaux	16
1.4.3	Thérapie génique.....	16
1.4.4	Thérapie neuroprotectrice	18
1.5	Nur77	19
1.5.1	Les facteurs de transcription : Nur77.....	20
1.5.2	Nurs, les rétinoïdes et les systèmes dopaminergiques	21
1.5.3	Nur77 et sa liaison à l'ADN	22
1.5.4	Nur77 et sa liaison avec Bcl-2	23
1.5.5	Nur77 : croissance et apoptose	25
1.5.6	Similarité entre Nur77 et p53.....	25
1.6	Stress oxydant.....	26
1.6.1	Le stress oxydant reproduit expérimentalement par la 6-OHDA	28
1.7	Apoptose	30
1.7.1	Définition.....	30
1.7.2	Caractéristiques morphologiques de l'apoptose	31
1.7.3	Les voies d'apoptose.....	32
1.7.4	Caractéristiques morphologiques de l'apoptose et de la nécrose	33
1.8	Les membres de la famille Bcl-2	34
1.8.1	Bax.....	35
1.9	Gène suppresseur (p53)	36
1.9.1	p53 une protéine clé impliquée dans les différentes voies apoptotiques.....	36
1.9.2	L'importance de l'apoptose et de p53 dans la MP.....	37
1.10	Facteur inducteur d'apoptose (AIF).....	39
1.11	Poly (ADP-ribose) polymérase (PARP-1).....	42
1.12	Leptomycine B.....	43
1.12.1	Mécanisme d'action de la LMB.....	43
1.13	Objectif du mémoire	44

CHAPITRE II	
MATÉRIELS ET MÉTHODES	46
2.1 Culture cellulaire	46
2.2 Traitement des cellules	47
2.3 Test de cytotoxicité.....	48
2.3 Extraction des protéines.....	49
2.3.1 Extraction des protéines cytoplasmiques et nucléaires.....	50
2.3.2 Extraction de la protéine totale	50
2.3.3 Immunobuvardage de type Western	51
2.4 Analyse statistique.....	52
CHAPITRE III	
RÉSULTATS.....	53
3.1 Effets de la LMB sur la translocation de Nur77	53
3.2 Effet neuroprotecteur de la LMB sur la toxicité induite par la 6-OHDA.....	55
3.3 Modulation de l'expression de la protéine Bax/Bcl-2	56
3.4 Modulation de l'expression du gène suppresseur p53	58
3.5 Étude de la translocation de AIF des mitochondries vers le noyau	60
3.6 Modulation de l'expression du Poly (ADP-ribose) polymérase (PARP-1).....	62
CHAPITRE IV	
CONCLUSIONS	64
4.1 Perspectives de recherche	71
BIBLIOGRAPHIE.....	73

LISTE DES FIGURES ET TABLEAU

Figure	Page
1.1 Posture caractéristique d'un patient parkinsonien	3
1.2 Les relations entre la mort cellulaire et la formation des CL dans la MP	7
1.3 La voie nigro-striée en condition normale et en condition pathologique	8
1.4 Les immunomarquages de différents composants des corps de Lewy	9
1.5 Les différentes mutations génétiques et diverses modifications observées dans la MP	14
1.6 Représentation schématique de la séquence de Nur77	20
1.7 Mode d'action d'un facteur de transcription	21
1.8 Les différents types de liaison de Nur77	23
1.9 Mécanisme de transcription de l'activité de Nur77	24
1.10 Transformation de Bcl-2 par Nur77	25
1.11 Similarité entre Nur77 et p53 sur la mort apoptotique	26
1.12 Sites de production de ROS dans la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie	27
1.13 Stress oxydant induit par une rupture d'équilibre entre la production et l'élimination de radicaux libres	28
1.14 Mécanismes impliqués dans la toxicité de la 6-OHDA et du MPTP	30
1.15 Evolution morphologique d'une cellule en apoptose	32

1.16	Représentation simplifiée des voies intrinsèque et extrinsèque	33
1.17	Section de cerveau de patient parkinsonien marqué par TUNEL.....	34
1.18	Réponse à l'activation de p53	38
1.19	Représentation simplifiée des deux voies pouvant être induites par p53 après un stress	39
1.20	Structure primaire du facteur inducteur d'apoptose	40
1.21	Libération de AIF	41
1.22	Étape finale de l'apoptose : fragmentation d'ADN	41
1.23	Structure primaire de PARP-1	43
1.24	Structure chimique de la leptomycine B.....	43
1.25	Mécanisme d'action de la LMB	44
2.1	Cellules PC12 : A : PC12 naïves, B : PC12 différenciées.....	47
2.2	Stratégie pour l'élaboration des traitements des cellules.....	47
2.3	Schéma des réactions enzymatiques impliquées dans le test de cytotoxicité.....	49
3.1	Modulation de l'expression de Nur77 dans le noyau et dans le cytoplasme suite au traitement à la 6-OHDA avec ou sans pré-traitement à la LMB	54
3.2	Effet de la LMB sur la translocation de Nur77 du noyau au cytoplasme.....	55
3.3	Mesure de la mort cellulaire par la technique de la LDH après traitement à la 6-OHDA avec ou sans pré-traitement avec la LMB.....	56

3.4	Effet de la modulation de l'expression de Bax et Bcl-2 suite au traitement à la 6-OHDA avec ou sans pré-traitement avec la LMB.....	57
3.5	Effet de la LMB sur la modulation de Bax/Bcl-2.....	58
3.6	Modulation du gène suppresseur p53 suite au traitement avec la 6-OHDA, avec ou sans LMB	59
3.7	Effet de la LMB sur la modulation de p53	60
3.8	Effet de la modulation de la protéine AIF après traitement à la 6 OHDA avec ou sans pré-traitement à la LMB	61
3.9	Effet de la LMB sur la modulation de AIF	62
3.10	Effet de la modulation de la protéine PARP-1 après traitement à la 6 OHDA avec ou sans pré-traitement à la LMB	63
3.11	Effet de la LMB sur la modulation de PARP-1	63

Tableau

2.1	Les anticorps utilisés avec leur dilution.....	52
-----	--	----

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNSS	Acide désoxyribonucléique simple brin
AMS	Atrophies multi systématisées
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AIF	Facteur inducteur d'apoptose
AF-1	Activation de la fonction 1 (AF-1)
Bax	Bcl-2-associated X protein
BCA	Bicinchoninic acid
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 protein
BH	Bcl-2 homology
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BRCT	Abréviation du domaine C-terminal
CL	Corps de Lewy
CRM1	Chromosome région maintenance 1
DA	Dopamine
DBD	Domaine de liaison du ligand
DHA	Acide docosahexaénoïque
E	Estrogènes
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FADD	Fas Associated Death Domain
FasI	Fas ligand
FBS	Sérum bovin foetal
FDG	Fluorodeoxy glucose
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
HDAC1	Histone déacétylase 1
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogènes
HS	Serum de cheval
LDH	Lactate déshydrogénase

6-OHDA	6-hydroxydopamine
LMB	Leptomycine B
L-Dopa	Lévodopa
MLS	Signal de la localisation mitochondriale
MPP+	1-méthyl-4-phénylpyridinium
NAD+	Nicotinamide adenine dinucleotide
NOR1	Récepteur nucléaire orphelin 1
Nurr1	Nuclear receptor related 1
Nur77	Nuclear receptor related 77
NLS	Signal de localisation nucléaire
NO	Monoxyde d'azote
NST	Technique d'intégration neurostructurale
OH	Radical hydroxyle
PAR	Poly ADP-ribose
Park	Parkine gene
PARP	Poly ADP-ribose polymersae
PET	Topographie par émission de positrons
PINK-1	pten-induced kinase
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
RONS	Espèces réactives de l'oxygène et d'azote
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RXR	Récepteur rétinoïde
SN	Substance noire
SNr	Substance noire réticulée
SNC	Système nerveux central
SNPc	Partie compacte de la substance noire
TBS-t	Tampon tris saline avec Tween
TH	Tyrosine Hydroxylase
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TP	Température pièce
TUNEL	Terminal dUTP nicked-end labelling

UCH-L1	Uubiquitine C-terminalhydrolase L1
VTA	Aire tegmentale

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 La maladie de Parkinson

1.1.1 Bref historique de la maladie de Parkinson

La première description de la maladie de Parkinson (MP) remonte à 1817, date à laquelle un médecin britannique du nom de James Parkinson rédigea un livre appelé « *An essay on the shaking palsy* » (*Essai sur la paralysie agitante*) (1817). Il y décrit les cas de six patients présentant des tremblements involontaires des membres avec diminution de la force musculaire dans les parties du corps au repos, et même lorsque soutenus, une propension à courber le tronc vers l'avant. Également, il nota que cinq autres patients avaient une propension à courber le dos, et à passer de la marche à la course, mais les sens et l'intellect n'étaient pas atteints. J. Parkinson associa tous ces symptômes à une seule et même maladie qu'il nomma « *Shaking Palsy* ». Plus tard, à la fin du XIXe siècle, le Dr Jean Martin Charcot ajouta la rigidité à l'excellente description clinique de Parkinson, désigna cette maladie comme un syndrome et décida de lui donner le nom de la « maladie de Parkinson ».

Aujourd'hui, la MP se définit plutôt par les symptômes suivants : akinésie, bradykinésie ou hypokinésie, trois termes souvent confondus (voir 1.1.3.1.3). Gowers décrivait que la MP consiste en des tremblements, de la rigidité, de l'instabilité posturale, une démarche courbée et une lenteur musculaire progressive en partie due à sa rigidité (Gowers 1893). Plusieurs médecins ont aussi décrit cette maladie avec de nouveaux symptômes (Oppenheim 1911; Schwab et *al* 1959; Wechsler, 1932; Wilson 1940), mais du cumulatif de toutes les recherches, les termes : rigidité musculaire, tremblements au repos, akinésie, bradykinésie et hypokynésie restent les plus explicites comme références cardinales des symptômes de la MP.

1.1.2 Épidémiologie

La MP commence généralement après l'âge de 50 ans et affecte les deux sexes presque de la même manière. Parmi la population blanche, elle affecte entre 66 et 187 personnes sur 100 000. La population noire est peut-être partialement protégée. La prévalence de la MP est de 2 pour 1000 dans la population générale, s'élevant à 2 % au-delà de 65 ans. La MP se déclare généralement de façon sporadique autour de 60 ans avec une prévalence de 1-2 cas pour 1000. Cette prévalence augmente avec l'âge, en effet, on passe de 6-8 cas pour 1000 entre 65 et 69 ans, à 26-35 cas pour 1000 entre 85 et 89 ans. Elle débute en moyenne entre 55 et 65 ans, mais peut survenir à tout âge. Elle est de fréquence discrètement plus élevée chez les hommes que chez les femmes (Dluzen *et al.* 2003). Cette différence s'explique par le fait que les femmes possèdent une hormone féminine appelée estrogènes qui pourrait posséder des effets bénéfiques préventifs entre autres pour la MP (Amantea *et al.* 2005). Son incidence dans les pays occidentaux en fait le second syndrome neurodégénératif après la maladie d'Alzheimer. Il existe également des formes dites familiales ou génétiques qui représentent environ 5 % des cas, parmi elles les formes dites juvéniles sont plus précoces (entre 30 et 45 ans) et plus sévères. Dans 95 % des cas, il n'y a aucune liaison génétique.

1.1.3 Symptômes cliniques de la MP

Poser le diagnostic de la MP reste un acte clinique. L'apparition des symptômes cliniques se fait lorsqu'au moins 50 % des neurones dopaminergiques dans la partie compacte de la substance noire (SNpc) ont été détruits et avec 80 % de déficit de dopamine (DA) dans le striatum (Dauer *et al.* 2003). Des examens neurophysiologiques peuvent aider à objectiver certains symptômes dans des cas difficiles ou douteux cependant, il n'y a pas de test clinique conclusif pour diagnostiquer la MP. Les trois principaux symptômes de la maladie sont les tremblements au repos, la rigidité musculaire et la bradykinésie.

1.1.3.1 Symptômes moteurs

1.1.3.1.1 Tremblement au repos

Le tremblement parkinsonien survient quand l'activité musculaire volontaire est absente. Il s'observe le plus souvent chez un patient dont le segment de membre, le plus souvent l'avant-bras, est placé en appui au repos (Lee et *al* 2009) (voir figure 1.1). Il augmente beaucoup dans des situations de stress ou de fatigue, ou si on demande au patient de faire un effort intellectuel (calcul mental). Par contre, l'amplitude de tremblement se réduit lors de la détente musculaire et de la relaxation. Le tremblement disparaît pendant le sommeil.

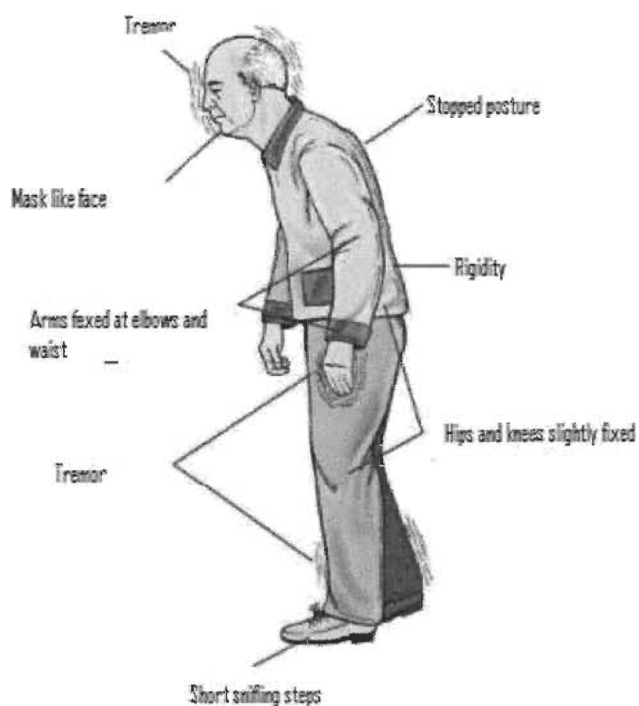


Figure 1.1 : Posture caractéristique d'un patient parkinsonien (Lees *et al.* 2009).

1.1.3.1.2 Rigidité musculaire

C'est la forme particulière d'hypertonie musculaire se traduisant par une résistance aux mouvements passifs. Elle est généralisée, touchant les muscles axiaux, proximaux et

distaux, mais on la mettra bien en évidence lors des mouvements de flexion et d'extension du poignet. Elle est accentuée ou mise en évidence lorsqu'on demande au patient par exemple d'étendre le bras, il apparaît alors une résistance involontaire des muscles antagonistes qui font plier le bras. La rigidité parkinsonienne s'accompagne d'une augmentation des réflexes de posture ou de réflexe de contraction d'un muscle après son raccourcissement.

1.1.3.1.3 Akinésie

L'akinésie est un phénomène complexe ayant plusieurs composantes : l'akinésie « vraie » et la bradykinésie. L'akinésie « vraie » traduit la difficulté et parfois l'impossibilité d'initier un acte volontaire en l'absence de paralysie. Cette akinésie s'observe encore plus pour les mouvements, obligeant le parkinsonien « à penser tous ses gestes ». La bradykinésie se manifeste par la lenteur des gestes et affecte beaucoup les activités de tous les jours (Petit *et al.* 1994; Zagnoli *et al.* 2006). C'est le plus encombrant puisqu'il implique que les malades doivent consacrer plus de temps pour les tâches quotidiennes. L'hypokinésie est caractérisée par la lenteur ou le manque de mouvement. La présence d'au moins deux de ces trois symptômes permet de dire que le patient est atteint de la MP.

1.1.3.2 Symptômes non moteurs

1.1.3.2.1 Les troubles sensitifs

Les troubles sensitifs sont très fréquents chez les parkinsoniens (Charcot 1880; Souques 1921). Les douleurs sont souvent vives, surviennent par crises (Toda *et al.* 2010) et peuvent durer plusieurs mois ou persister tout au long de l'évolution de la maladie (Hanagasi *et al.* 2011). Elles siègent dans les articulations ou le long des membres, dans certains cas, on peut avoir une forte et profonde douleur avec l'impression qu'on scie un membre, qu'on arrache la peau (Souques, 1921) ou encore une sensation de brûlure.

1.1.3.3 Les troubles psychiques

Un premier point concerne l'existence ou non d'une détérioration intellectuelle et à ce propos, Souques (1921) signalait que l'intelligence est intacte chez le parkinsonien et que les troubles sont plus apparents que réels. Le visage est inexpressif, hébété, les réponses sont lentes et difficiles, mais derrière ce masque « le raisonnement est juste, le jugement sain, l'esprit est vif et lucide ». Il convient par contre d'insister sur le désintérêt et le manque de motivation de ces malades. De plus, l'attention du sujet étant tout investie dans la réalisation motrice, il ne peut plus se concentrer de façon suffisante sur les réalisations intellectuelles ou sur les communications avec l'entourage.

Par contre, les études faites de 1922 à nos jours démontrent que les parkinsoniens présentent de la démence (Cummings 1988). Cependant, les résultats sont très différents d'une étude à l'autre et peuvent être récapitulés de la manière suivante : les deux études réalisées avant 1960 ont trouvé une prévalence moyenne de 22 % alors que celles faites en 1960 ont démontré qu'en moyenne 17 % des malades avaient des problèmes liés à leur intelligence. Dans les années 1970, le pourcentage était de 42,5 % et enfin les études faites dans les années 1980 ont révélé une démence qui peut être évaluée à 43,3 %. La prévalence la plus faible (4 %) a été signalée en 1922 (Patrick *et al.* 1922) et la plus élevée (93 %) a été signalée en (Pirozzolo *et al.* 1982).

1.1.3.3.1 Les troubles de l'affectivité

Les troubles de l'affectivité sont beaucoup plus fréquents, le parkinsonien ressent normalement les émotions, mais généralement ces sujets sont tristes, inquiets, irritables et exigeants vis-à-vis de l'entourage. L'élément dominant est une anxiété qui survient sur un fond dépressif (Politis *et al.* 2010). Ces facteurs dépressifs surviennent indépendamment de l'âge, du sexe des patients, indépendamment aussi de l'ancienneté de l'affection et de l'importance du trouble moteur qu'elle entraîne (Horn, 1974).

1.1.3.3.2 Les troubles du sommeil

Les troubles du sommeil se manifestent par une insomnie avec des difficultés à l'endormissement et des réveils fréquents (Kales *et al* 1971). Pour Schott et ses collaborateurs (1971), 44 % des parkinsoniens se plaignent d'insomnie (Hobson *et al.* 2002; Mitra *et al.* 2009) ou d'une diminution relative du temps de sommeil avec une durée moyenne de 5 à 6 heures. En outre, les troubles du sommeil contribuent à une excessive somnolence journalière, qui va créer chez le patient un manque d'enthousiasme et une réduction de réalisation de ses activités quotidiennes (Menza *et al.* 2010). Schott et ses collaborateurs signalent aussi que ces patients présentent des perturbations motrices et une agitation gestuelle au cours du sommeil. 28 % des patients font fréquemment des rêves au cours desquels le malade se trouve libéré de toute contrainte posturale.

1.2 Neuropathologie

1.2.1 Caractéristiques

En absence d'examen neuropathologique, James Parkinson (1817) suggérait que les lésions neuropathologiques siégeaient sur la partie supérieure de la moelle cervicale et qu'elles pouvaient s'étendre sur la partie basse du bulbe lors de l'évolution de la maladie.

Du point de vue neuropathologique récent, la MP est une entité pathologique raisonnablement définie. Le diagnostic de la pathologie nécessite la perte de mélanine des neurones dopaminergiques (voir figure 1.2) dans la *substantia nigra «pars compacta»* (SNpc) (Cookson *et al.* 2008). Le déficit en dopamine striatale qui en résulte est la caractéristique symptomatologique de cette maladie. Il existe néanmoins d'autres lésions dans d'autres noyaux sous corticaux, comme le *locus coeruleus*, le *nucleus basalis de Meynert*, mais la perte de neurones de la SNpc est extrêmement dramatique et est l'événement pathologique majeur qui caractérise la MP. Cependant, la mort cellulaire n'est pas suffisante pour le diagnostic pathologique. La plupart des définitions exigent

également la présence de corps de Lewy (Hughes *et al.* 2001) qui sont des dépôts intra neuronale de lipides et de protéines, principalement une petite protéine appelée α -synucléine. Les corps de Lewy ne sont pas vraiment spécifiques pour cette maladie parce qu'ils sont trouvés dans d'autres troubles, par exemple la maladie d'Alzheimer (Okazaki *et al.* 1961; Kosaka *et al.* 1984). En conclusion, le diagnostic neuropathologique de la MP nécessite la présence de corps de Lewy et la perte des neurones dopaminergiques (voir figure 1.2).

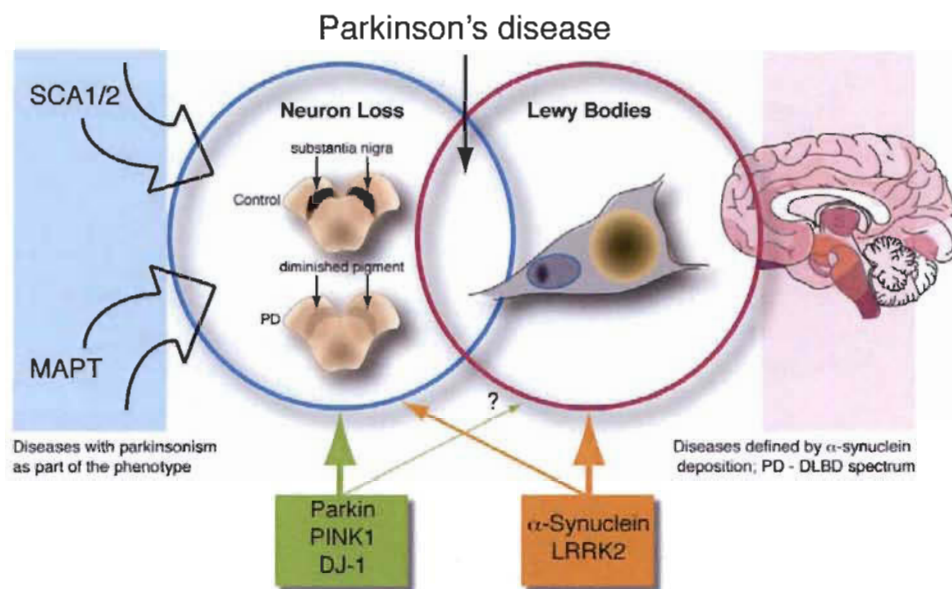


Figure 1.2 : Les relations entre la mort cellulaire et la formation des CL dans la MP (Kosaka *et al.* 1984).

1.2.2 Perte de la pigmentation

Chez les patients parkinsoniens, les premiers symptômes moteurs n'apparaissent que lorsqu'on observe une perte de près de 60 à 80 % des neurones dopaminergiques. La dépigmentation de la substance noire permet de rendre compte de la disparition des neurones dopaminergiques contenant des pigments de neuromélanine (Dauer *et al.* 2003). Les fibres nerveuses projetant de la substance noire vers le putamen et le noyau caudé sont directement affectées par la forte diminution du taux de dopamine produit par les neurones dopaminergiques, ce qui conduit à une perte progressive du contrôle moteur

(voir figure 1.3). Les mécanismes contribuant à la perte progressive des neurones dopaminergiques de la SNpc sont mal connus. Cependant, nous savons que cette dégénérescence est principalement due à une exacerbation des phénomènes d'apoptose (Mochizuki *et al.* 1996). La disparition du système dopaminergique s'accompagne d'une dégénérescence progressive d'autres voies nerveuses telles que les systèmes noradrénergiques (au niveau du *locus coeruleus*) (Remy *et al.* 2005) et les systèmes cholinergiques (au niveau du noyau basal de Meynert) (Spehlmann *et al.* 1976).

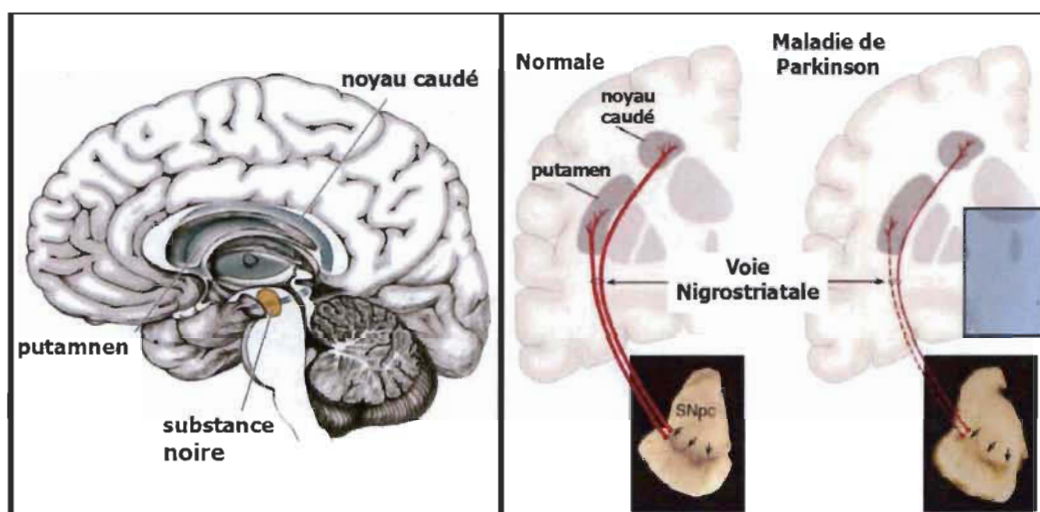


Figure 1.3 : La voie nigro-striée en condition normale et en condition pathologique. À gauche, les différents noyaux composant la voie nigro-striatale. À droite, le circuit reliant la substance noire au putamen et au noyau caudé (d'après Dauer W. *et al.* 2003).

1.2.3 Les corps de Lewy (CL)

En 1912, F.H. Lewy a décrit pour la première fois des inclusions cytoplasmiques présentes dans les noyaux neuronaux de patients atteints par la MP (Lewy 1912; Holdorff 2002). On les nomme aujourd'hui corps de Lewy lorsque ces inclusions ont une forme globulaire, et « neurites de Lewy » lorsqu'elles ont une forme de fuseau. On retrouve ces inclusions dans d'autres pathologies neurodégénératives telles que la Démence à CL ou encore dans les AMS « atrophies multisystématisées ». Les CL sont des inclusions intracytoplasmiques principalement constitués de protéines agrégées. Quelle que soit la maladie dans laquelle on les observe, la composante majeure des CL

est l' α -synucléine (Spillantini *et al.* 1997). Actuellement, plus de 70 protéines ont été identifiées dans les CL (Wakabayashi *et al.* 2007). Il est intéressant de noter que parmi ces 70 protéines on retrouve les protéines impliquées dans les formes familiales de la maladie de Parkinson : la parkine (voir figure 1.4), PINK1 (Schlossmacher *et al.* 2002; Gandhi *et al.* 2006), DJ-1 (Bandopadhyay *et al.* 2004), l' α -synucléine (Spillantini *et al.* 1997), UCHL1 (Lowe *et al.* 1990), LRRK2 (Miklossy *et al.* 2006) et la synphiline-1 (Wakabayashi *et al.* 2000). Les CL sont une caractéristique histologique de la MP. Généralement à l'autopsie presque tous les parkinsoniens ont des CL alors que seulement 10 % des gens qui décèdent d'une maladie autre que la MP présentent des CL (Pollak 2004).

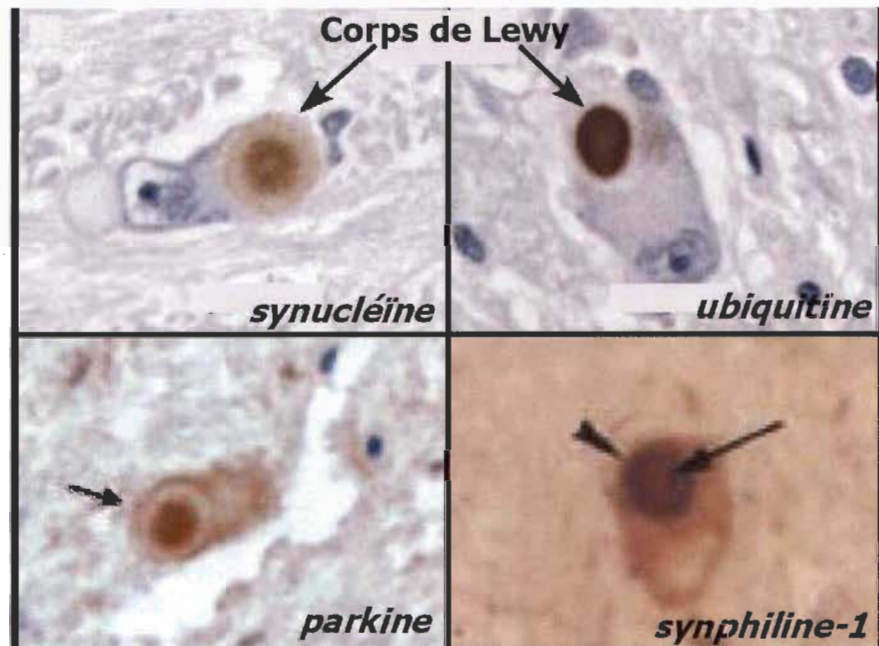


Figure 1.4 : Les immunomarquages de différents composants des corps de Lewy (Spillantini *et al.* 1997).

1.3 L'étiologie de la maladie de Parkinson

La pathogenèse de la MP est fréquemment associée à trois dysfonctions majeures qui apparaissent dans le cerveau des patients. Des dysfonctions de la mitochondrie associées au stress oxydant sont considérées comme jouant un rôle majeur dans le

développement de cette maladie, à ceux-ci s'ajoute une augmentation des protéines mal repliées provoquée par des défauts au niveau du système ubiquitine-protéasome. Que ce soit dans les cas de formes sporadiques ou de formes familiales, le mauvais fonctionnement des mitochondries entraîne la troisième étape appelée dégénérescence neuronale. Le lien direct entre la MP et le mauvais fonctionnement mitochondrial a été établi par des études *post-mortem*, décrivant une déficience du complexe-I de la chaîne respiratoire au niveau de la substance noire, dans les neurones et dans les cellules gliales des parkinsoniens (Mizuno *et al.* 1989; Schapira *et al.* 1989). Cette déficience du complexe-I est également visible au niveau du muscle squelettique et des plaquettes (Bindoff *et al.* 1989; Parker *et al.* 1989). Dans la MP, seules la stabilité structurale et l'activité du complexe-I de la chaîne respiratoire sont affectées par une augmentation de l'oxydation endogène (Keeney *et al.* 2006). Chez des parkinsoniens, on observe au niveau mitochondrial, une diminution de la production d'ATP, une génération de radicaux libres et une augmentation des processus apoptotiques dus à la sensibilisation accrue des cellules par la protéine pro-apoptotique Bax (Perier *et al.* 2005). Dans la majorité des cas, la MP est néanmoins sporadique et vraisemblablement d'origine multifactorielle avec l'implication de facteurs génétiques et environnementaux.

1.3.1 Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux sont fortement suspectés depuis qu'ils ont été mis en évidence à la fin des années 70 par la découverte d'un syndrome parkinsonien d'origine toxique chez des toxicomanes de la côte ouest des États-Unis. Ces derniers s'étaient en effet injectés involontairement un produit chimique, le MPTP, qui s'est révélé être sélectivement toxique pour les neurones dopaminergiques. Suite à ces observations et à des études épidémiologiques, les recherches faites sur une éventuelle surexposition des patients à des agents chimiques de structure proche de celle du MPTP, comme certains insecticides et pesticides, ont permis d'obtenir différents résultats. Les résultats de ces études sont contradictoires, certaines ont montré un risque de développement de MP plus élevé chez les gens exposés à ces toxiques, d'autres études n'ont pas été très concluantes. Des études écologiques au Canada et en Californie ont

montré une association entre des mesures d'utilisation des pesticides et la MP (Barbeau *et al.* 1987; Ritz *et al.* 2000). De plus, dans une étude taïwanaise, l'exposition au paraquat pendant plus de 20 ans était associée à la MP (Liou *et al.* 1997) tandis qu'en Allemagne, une association significative était retrouvée pour les organo-chlorés et carbamates (Seidler *et al.* 1996).

1.3.2 Facteurs génétiques

Chez 15 % des patients environ, on retrouve cette maladie dans leurs antécédents familiaux. De façon exceptionnelle, l'hérédité est de type autosomique dominant. Dans quelques-unes de ces familles, il a été mis en évidence une mutation dans le gène codant pour l'alpha-synucléine (chromosome 4). Plus fréquemment, on observe une hérédité de type autosomique récessive. Dans 10 % des formes familiales, une mutation dans le gène codant pour une protéine de fonction encore inconnue, la « parkine » (chromosome 6), a été identifiée dans les populations européennes et japonaises. Principalement six gènes sont associés à des formes dominantes ou récessives de la maladie incluant : α -synucléine, Parkine, UCH-L1, PINK1, DJ-1 et LRRk2/dardarine (Harvey *et al.* 2008) (voir figure 1.5).

1.3.2.1 PARK1 : α -synucléine

Le gène α -synucléine a été décrit pour la première fois en 1997 et est présent sur le chromosome 4q21. Il a été découvert dans une grande famille avec un parkinsonisme hérité sur un mode autosomique dominant (Polymeropoulos *et al.* 1997). Le gène α -synucléine est situé au niveau du locus PARK1 et a été le premier gène à être identifié dans la MP. Il a un mode de transmission dominant et sa protéine est retrouvée sous forme d'agrégats dans les CL (Spillantini *et al.* 1998; Conway *et al.* 2000). En ce qui concerne la forme sporadique de la MP, les malades présentant le phénotype α -synucléine sont plus jeunes (46,5 ans en moyenne) comparé à ceux présentant d'autres génotypes et aussi, ils ont une évolution très rapide comparée à l'évolution de la MP causé par d'autres gènes (Golbe *et al.* 1990). La protéine α -synucléine est retrouvée en

abondance dans le tissu cérébral et est l'un des constituants majeurs des CL (Spillantini *et al.* 1997).

1.3.2.2 PARK 2 : la parkine

Découverte en 1998 au Japon (Kitada *et al.* 1998) chez des sujets souffrant d'un parkinsonisme juvénile de transmission autosomique récessive avec une bonne réponse thérapeutique. Le phénotype diffère de la forme sporadique de la maladie par un début souvent précoce, une progression lente, une dystonie fréquente dès le début de la maladie et des dyskinésies sous traitement dopaminergique (Lucking *et al.* 2000). Il s'agit du gène le plus fréquemment impliqué dans les parkinsonismes du sujet jeune, avec une mutation retrouvée chez 77 % des patients de moins de 20 ans et de 26 % chez des individus compris entre 21 et 30 ans (Lucking *et al.* 2000). L'examen pathologique ne présente pas les CL (Mori *et al.* 1998), hormis dans certains cas isolés (Farrer *et al.* 2001).

1.3.2.3 PARK 5 : ubiquitine C-terminalhydrolase L1 (UCH-L1)

La mutation du gène ubiquitine C-terminalhydrolase L1 (UCH-L1) a été décrite pour la première fois en 1998 par Leroy et ses collaborateurs. PARK5 est responsable d'un parkinsonisme autosomique dominant ressemblant à la forme sporadique de la MP, mais avec un début plus précoce (Leroy *et al.* 1998), UCH-L1 fait partie d'une famille de protéines qui hydrolysent les extrémités C-terminales des molécules d'ubiquitine, afin d'en permettre le recyclage. *In vitro*, la forme mutée I93M de UCH-L1 a une activité enzymatique réduite, ce qui entrave la voie ubiquitine-protéasome (Leroy *et al.* 1998).

1.3.2.4 PARK 6 : PINK-1

Un parkinsonisme autosomique récessif d'un sujet jeune a été associé à un locus situé sur le chromosome 1p35–36 au sein d'une famille italienne (Valente *et al.* 2001). Hormis l'âge et l'évolution lente, le phénotype est semblable à celui de la forme

sporadique. Cette forme répond très bien au traitement avec la L-Dopa (Valente *et al.* 2002). Une étude par tomographie par émission de positrons (PET) et à la 6-Fluorodeoxyglucose (6FDG) scan a montré une réduction non seulement dans le putamen postérieur, mais également aussi dans la partie antérieure du putamen ainsi que dans la tête du noyau caudé, avec un gradient moindre que celui observé dans la forme sporadique de la maladie (Khan *et al.* 2002; Khan *et al.* 2002).

1.3.2.5 PARK 7 : la DJ-1

Récemment, l'étude de deux familles avec un parkinsonisme autosomique récessif, l'une hollandaise et l'autre italienne, a permis de mettre en évidence d'une délétion et une mutation ponctuelle sur le chromosome 1p36, au niveau du locus PARK 7, entièrement contenues dans le gène DJ-1 (Bonifati *et al.* 2003). Bien que la fonction précise de cette protéine soit inconnue à ce jour, certains arguments font penser qu'elle pourrait être impliquée dans les mécanismes de défense cellulaires contre le stress oxydant.

1.3.2.6 PARK 8 : la dardarine

Ce locus est situé sur le chromosome 12 et a été décrit au sein d'une famille japonaise avec un parkinsonisme autosomique dominant semblable à la forme sporadique de la maladie. Cette forme débute vers 50 ans et a une bonne réponse au traitement pharmacologique (Funayama *et al.* 2002). La pénétrance du gène est probablement réduite. L'examen pathologique pratiqué sur plusieurs patients a montré l'absence de CL.

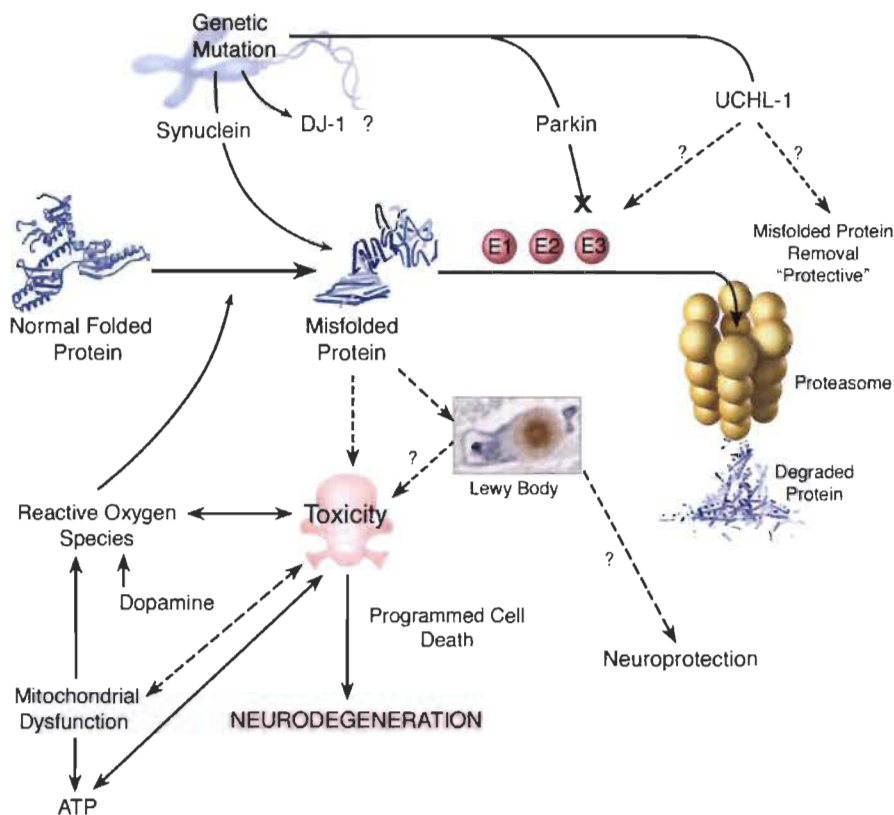


Figure 1.5 : Les différentes mutations génétiques et diverses modifications observées dans la MP (Dauer *et al.* 2003).

1.4 Traitements de la maladie de Parkinson

De nos jours, il n'existe aucun traitement curatif. Les traitements actuels qui peuvent être proposés ont pour principal objectif de corriger les symptômes, en particulier moteurs, permettant ainsi d'atténuer leurs conséquences sur la vie du patient et d'augmenter son espérance de vie. Ils sont principalement classés en quatre catégories : pharmacologiques, chirurgicaux, géniques et neuroprotecteurs.

1.4.1 Traitements pharmacologiques

Ils sont à l'heure actuelle ceux qui donnent les meilleurs résultats. Leur objectif principal est de rétablir l'activité dopaminergique soit par l'apport des précurseurs ou d'agonistes de la dopamine, soit en limitant la dégradation de la dopamine libérée par les neurones dopaminergiques. Ces traitements utilisent une combinaison de L-DOPA, le

précurseur de la dopamine capable de traverser la barrière hématoencéphalique (Andersen *et al.*), et de cabidopa, un inhibiteur de la décarboxylase périphérique. La L-DOPA est administrée par voie orale et se distribue largement à tous les tissus y compris le cerveau où elle est décarboxylée en dopamine et stockée dans les neurones. Cependant, la formation périphérique de la dopamine, molécule qui ne peut pas traverser la BHE, est la source de nombreux effets secondaires indésirables qui sont considérablement réduits par des inhibiteurs de la décarboxylase périphérique. La demi-vie plasmatique de la L-DOPA est très courte, de l'ordre de 1,5 à 3 heures (en présence d'inhibiteur de la décarboxylase). Ce sont les neurones dopaminergiques survivants qui assurent l'amortissement de cette cinétique grâce à leur capacité de stockage et de libération de la dopamine, permettant ainsi d'être particulièrement effectifs sur l'akinésie et la rigidité lors des premiers stades de la maladie. Cependant, lorsque la pathologie progresse, il y a de moins en moins de neurones dopaminergiques capables de synthétiser de la dopamine, entraînant ainsi un effet moindre du traitement et engendrant aussi des nouveaux troubles moteurs induits par la L-dopa telles que des dyskinésies (Obeso *et al.* 2000).

Il existe aussi des traitements utilisant des agonistes dopaminergiques ou des inhibiteurs enzymatiques. Les agonistes dopaminergiques stimulent les récepteurs D2 et leur activité pharmacologique n'est pas influencée par le stock de neurones dopaminergiques puisqu'ils agissent sur les récepteurs post-synaptiques. Cependant, ils possèdent des propriétés alpha-adrénergiques et sérotoninergiques responsables d'effets indésirables (vasospasme, œdème des membres inférieurs, fibrose pulmonaire). Les agonistes plus récents sont des composés synthétiques plus spécifiques des récepteurs D2 présentant moins d'effets secondaires.

Les inhibiteurs enzymatiques permettent de prolonger l'effet thérapeutique de la L-DOPA en inhibant les enzymes participants à sa dégradation telle que la mono amine oxydase (MAO) et la catéchols-o-méthyle transférase (COMT) qui transforment la L-DOPA en 3-o-methyldopa, un métabolite inactif et antagoniste à la pénétration de la

L-DOPA dans le cerveau. Ils permettent d'augmenter la biodisponibilité de la L-DOPA et sa demi-vie plasmatique.

1.4.2 Traitements chirurgicaux

Ce sont des traitements envisagés dans les stades avancés de la MP et généralement utilisés quand les traitements pharmaceutiques ne sont plus suffisants. La chirurgie d'ablation peut être l'un de ces traitements, proposant une lésion ciblée d'une partie du cerveau comme la pallidectomie ou encore la thalamotomie. En effet, on peut effectuer une lésion par électrocoagulation à haute fréquence dans les régions du pallidum, par la technique d'intégration neurostructurale (NST) et en modérant l'activité inhibitrice excessive du complexe *globus pallidus interna*/substance noire réticulée (GPi/SNr) sur le thalamus. Cependant les inconvénients de cette technique lésionnelle résident dans leur caractère traumatique et irréversible souvent associé à des complications lorsque la lésion est bilatérale. Les bénéfices à long terme sont compromis par l'évolution de la pathologie (Walter *et al.* 2004). Il existe aussi une approche chirurgicale souvent combinée à l'administration de la L-DOPA et de la carbidopa permettant de pratiquer des stimulations cérébrales profondes dans les régions du pallidum et la NST (Pelmutter et Mink, 2006) qui ont pour effet de soulager les symptômes. La technique consiste à implanter des microélectrodes dans une de ces régions cérébrales, puis à pratiquer une stimulation électrique à haute fréquence qui aura un rôle inhibiteur sur l'activité neuronale de cette zone. Les possibilités d'appliquer ce traitement d'une manière bilatérale avec un caractère réversible et d'ajuster en permanence les paramètres de la stimulation en font des avantages importants. Par contre, son développement reste limité pour son coût prohibitif et sa technicité élevée.

1.4.3 Thérapie génique

Elle utilise les gènes comme médicaments et reste encore expérimentale. Cette technique implique l'introduction des gènes dans des cellules soit pour remplacer un gène déficient, soit pour produire des protéines spécifiques nécessaires pour combattre

ou corriger les maladies visées. Les progrès récents dans la connaissance des mécanismes impliqués dans la dégénérescence neuronale, ainsi que le développement des techniques de biologie moléculaire et de transfert de gènes ont ouvert de nouvelles possibilités de traitements thérapeutiques pour les maladies neurodégénératives. Les gènes thérapeutiques peuvent être introduits dans le système nerveux central (SNC) par deux types d'approches, soit de manières indirectes *ex vivo*, ou directes *in vivo*.

Dans la thérapie génique *ex vivo*, les gènes thérapeutiques sont introduits *in vitro* dans des neurones ou dans des cellules non neuronales qui seront ensuite transplantées. Ces cellules peuvent être des cellules autologues, allogéniques ou xénogéniques. L'emploi des cellules autologues contourne le problème du rejet, mais demande une mise en place de banques de cellules spécifiques pour chaque individu. L'utilisation des cellules allogéniques et xénogéniques reste plus limitée à cause du risque de rejet qui, néanmoins, est moins important dans le cerveau, site privilégié sur le plan immunitaire. La thérapie génique directe dans le SNC permet l'expression de protéines spécifiques par les cellules de l'hôte, avec une libération locale évitant ainsi les effets secondaires de ces protéines lorsqu'elles sont administrées par d'autres voies. Cependant, le transfert du gène dans des cellules nécessite toujours une injection intracérébrale. Dans les deux types d'approches, l'efficacité de la thérapie génique dépendra principalement du choix des deux vecteurs qui peuvent être : soit des vecteurs des macromolécules synthétiques (liposomes, lipides, polymères cationiques), soit des vecteurs viraux qui constituent aujourd'hui le système le plus efficace de transfert dans le système nerveux.

Également, pour la thérapie génique *ex-vivo*, le choix de véhicules cellulaires est important dans le transfert du gène. En effet, la transfection cellulaire *in vitro* a débuté sur des lignées cellulaires neuronales ou non neuronales, mais elle a rencontré le danger d'utiliser des cellules immortalisées proliférant après transplantation et pouvant éventuellement former des tumeurs *in vivo*. Afin d'éviter ce problème, des cultures primaires des cellules non neuronales comme les astrocytes ou les fibroblastes ont été utilisées (Chen *et al.* 1995; Cortez *et al.* 2000). Par la suite, des transferts de gènes par des vecteurs viraux ou des vecteurs synthétiques ont été développés sur des cultures de

cellules neuronales primaires ouvrant ainsi d'autres possibilités à la transplantation de cellules génétiquement modifiées (Levallois *et al.* 1994). Enfin, la transplantation des cellules transfectées encapsulées dans des sphères ou des polymères biodégradables constitue une approche prometteuse dans la thérapie génique. Cette encapsulation permet en plus une protection contre le système immunitaire de l'hôte (Aebischer *et al.* 1996). La voie d'administration est aussi importante dans l'efficacité et surtout dans la sécurité de la thérapie génique *in vivo*. Une injection directe par stéréotaxie est privilégiée si le but est d'atteindre des régions difficiles d'accès. Cependant, pour obtenir des bons résultats, une voie d'administration a été développée utilisant le transport axonal rétrograde, mais elle nécessite une population cellulaire particulière et surtout des cellules dans de bonnes conditions (Finiels *et al.* 1995; Ghadge *et al.* 1995).

1.4.4 Thérapie neuroprotectrice

Bien que des thérapies aient montré une efficacité dans les stades précoces de la maladie, une approche prometteuse pourrait être la mise en œuvre d'une thérapie neuroprotectrice utilisant des facteurs limitant ou stoppant le processus de dégénérescence. Les facteurs neurotrophiques pourraient jouer ce rôle. En effet, ce sont des molécules qui naturellement contrôlent le développement, la plasticité et l'intégrité structurale du système nerveux. Leur présence à l'âge adulte en faible concentration serait indispensable à la survie et au fonctionnement de certaines populations neuronales. La perte d'expression des facteurs neurotrophiques serait à l'origine du vieillissement et de la mort neuronale bien que leur implication dans ces mécanismes n'a pas été clairement démontrée (Hefti 1994; Zuccato *et al.* 2001). Plusieurs facteurs neurotrophiques sont actifs sur les neurones dopaminergiques parmi lesquels on note les mitogènes, des cytokines, et des gangliosides. Les effets de ces molécules peuvent être directs ou mettre en jeu les cellules gliales. Des études tendent à montrer que la dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la MP serait une mort cellulaire apoptotique (Tompkins *et al.* 1997) induite par l'absence des facteurs anti-apoptotiques. Ces observations permettent de penser que ces facteurs peuvent être introduits dans les traitements de la MP. Cependant, l'administration de ces facteurs neurotrophiques n'est

pas aisée, car elle doit tenir compte de plusieurs éléments comme la spécificité et la durée d'action. De plus, les facteurs neurotrophiques passent très peu la barrière hématoencéphalique (BHE) ce qui demande de très fortes doses en cas d'administration périphérique (orale, muqueuse nasale, absorption ou injection à travers la peau).

1.5 Nur77

Nur77, également connu comme facteur de croissance du nerf TR3 et induit par le clone B (NGFI-B) (Milbrandt 1988; Zhang *et al.* 1999), a été connu comme médiateur d'apoptose pour les cellules T (Lin *et al.* 2004) et les thymocytes (Liu *et al.* 1994; Woronicz *et al.* 1994). Nur77 est un récepteur nucléaire orphelin induit par différents stimuli tels que la croissance et le stress. Nur77 (aussi connu sous le nom TR3, NGFI-B, TIS1 et NAK-1) (Lim *et al.* 1987; Hazel *et al.* 1988; Milbrandt 1988; Chang *et al.* 1989) est un facteur de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Tous les membres de la superfamille ont une organisation structurale hautement conservée avec une fonction amine dans la région terminale qui code l'activation de la fonction 1 (AF-1), suivie par le domaine DNAbinding (DBD) (domaine de liaison de l'ADN) et le Ligand-binding domain (LBD) (domaine de liaison du ligand) (voir figure 1.6). La région C-terminale code l'activation de la fonction 2 (AF-2) (Kastner *et al.* 1995), Mangelsdorf et Evans, 1995). Des études récentes ont démontré que AF-1 joue un rôle majeur dans la transactivation de Nur77, tandis que AF-2 n'est pas indispensable (Wansa *et al.* 2002; Wansa *et al.* 2003). Nur77, Nurr1 (aussi connu comme RNR-1, TINUR, et HZF-3) et NOR-1 (MINOR, CHN, et TEC) forment une sous-famille distincte au sein de la superfamille des récepteurs nucléaires (Ferri *et al.* 2001; Zhang 2002; Hsu *et al.* 2004; Martinez-Gonzalez *et al.* 2005). Ils sont classés comme des récepteurs orphelins parce que leurs ligands physiologiques n'ont pas encore été identifiés (Kastner *et al.* 1995; Mangelsdorf *et al.* 1995). L'analyse structurale des LBD de Nurr1 ne révèle pas des classiques poches de liaison du ligand des récepteurs (Zhang 2002; Baker *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003), ce qui suggère que les fonctions biologiques de la sous-famille de Nur77 sont régulées par des mécanismes indépendants du ligand. Nur77 est unique parmi les récepteurs nucléaires parce qu'il est également un

gène immédiat et précoce induit par une diversité de stimulations extracellulaires, allant de la survie, à la différenciation et à l'apoptose. Ils travaillent par l'intermédiaire des modes d'action distincts, et comptent pour la diversité des activités biologiques de Nur77.

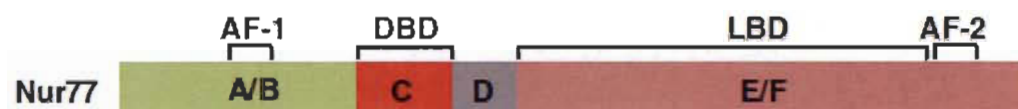


Figure 1.6 : Représentation schématique de la séquence de Nur77. AF-1 : activation fonction-1 (fonction d'activation 1), DBD : DNA-binding domain, LBD : Ligand-binding domain (domaine de liaison du ligande), AF-2 : Activation fonction-2 (fonction d'activation 2) (Moll *et al.* 2006).

1.5.1 Les facteurs de transcription : Nur77

Les facteurs de transcription reconnaissent généralement des petites séquences d'ADN conservées contenues au niveau des promoteurs de leurs gènes cibles. Certains de ces facteurs et de ces séquences sont communs à plusieurs gènes et utilisés de manière constitutive alors que d'autres sont des gènes spécifiques et leur activité est régulée par un mécanisme précis (voir figure 1.7).

Nur77 a été initialement identifié comme un gène immédiat précoce et rapidement induit par les facteurs de stress et de croissance, y compris le facteur de croissance du nerf (Benrimoj *et al.*) « nerve growth factor » (Benrimoj *et al.*). Malgré que Nur77 soit beaucoup exprimé dans divers tissus, cependant les séquences de son domaine de transactivation ne sont pas bien conservées (Ryseck *et al.* 1989; Bando *et al.* 1997). Nur77 est détecté principalement dans le thymus, les ostéoblastes, le foie et la glande pituitaire (Lindahl *et al.* 1995; Bando *et al.* 1997) et NOR1 est exprimé à un niveau élevé dans la glande pituitaire, mais à de faibles niveaux dans le thymus, les reins, le cœur, le muscle squelettique et les glandes surrénales (Lindahl *et al.* 1995; Tulin *et al.* 2003).

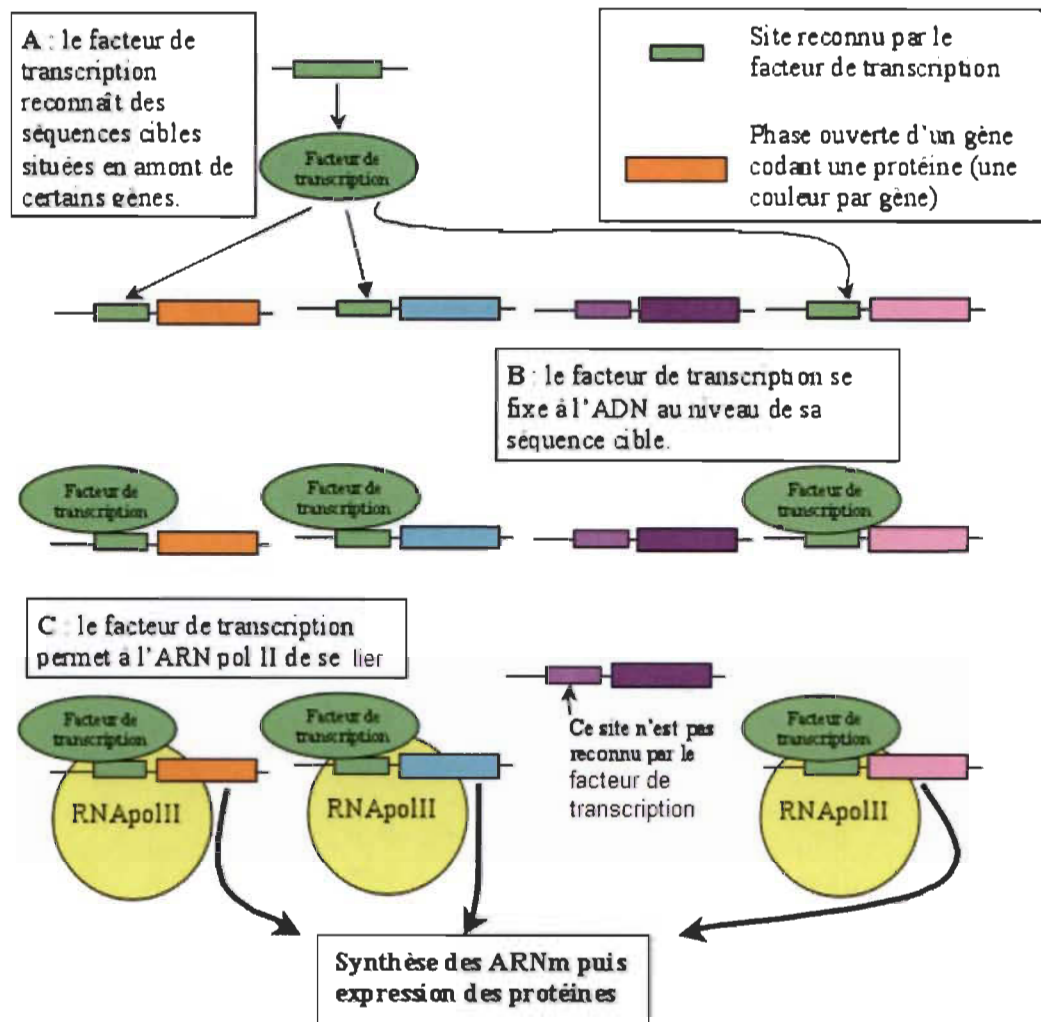


Figure 1.7 : Mode d'action d'un facteur de transcription.

1.5.2 Nurs, les rétinoides et les systèmes dopaminergiques

Des données récentes suggèrent que les membres du sous-groupe du récepteur nucléaire orphelin sont étroitement associés à la neurotransmission dopaminergique, à travers leur action en tant que facteurs de transcription. En l'absence de Nurr1, les précurseurs des neurones dopaminergiques du mésencéphale adoptent la localisation normale et un phénotype neuronal, mais pas le phénotype dopaminergique, comme démontré en l'absence d'expression de la tyrosine hydroxylase (TH) et tous les autres marqueurs dopaminergiques des neurones (Zetterstrom *et al.* 1997). Dans des conditions normales, Nur77 et NOR1 sont exprimés principalement dans les zones cibles des

neurones dopaminergiques, comme le cortex préfrontal et le striatum (Zetterstrom *et al.* 1996; Beaudry *et al.* 2000; Werme *et al.* 2000). Dans des conditions basales, leur taux d'ARNm est extrêmement faible dans la substance noire (SN) et l'aire tegmentale ventrale (VTA) du cerveau adulte (Zetterstrom *et al.* 1996). Cependant, leur expression peut être sensiblement augmentée dans le complexe SN-VTA par l'administration d'antagonistes des récepteurs D2 de la dopamine (Maheux *et al.* 2005).

1.5.3 Nur77 et sa liaison à l'ADN

Nur77 se lie à l'ADN sous forme monomère, homodimère ou hétérodimère avec le récepteur rétinoïde X (RXR) (Ullrich *et al.* 2001) (voir figure 1.8). Les domaines de liaison avec l'ADN sont homologues à 90 %, tandis que les domaines de liaison du ligand sont moyennement conservés chez les autres membres de cette sous-famille (Winoto 1997). Nur77 cède ses activités de promotion de croissance par son action dans le noyau qui exige sa liaison à l'ADN (Forman *et al.* 1995; Perlmann *et al.* 1995). Nur77 est constitutivement actif lorsqu'il est surexprimé, ce qui suggère la possibilité que son activité ne nécessite pas de stimulation du ligand.

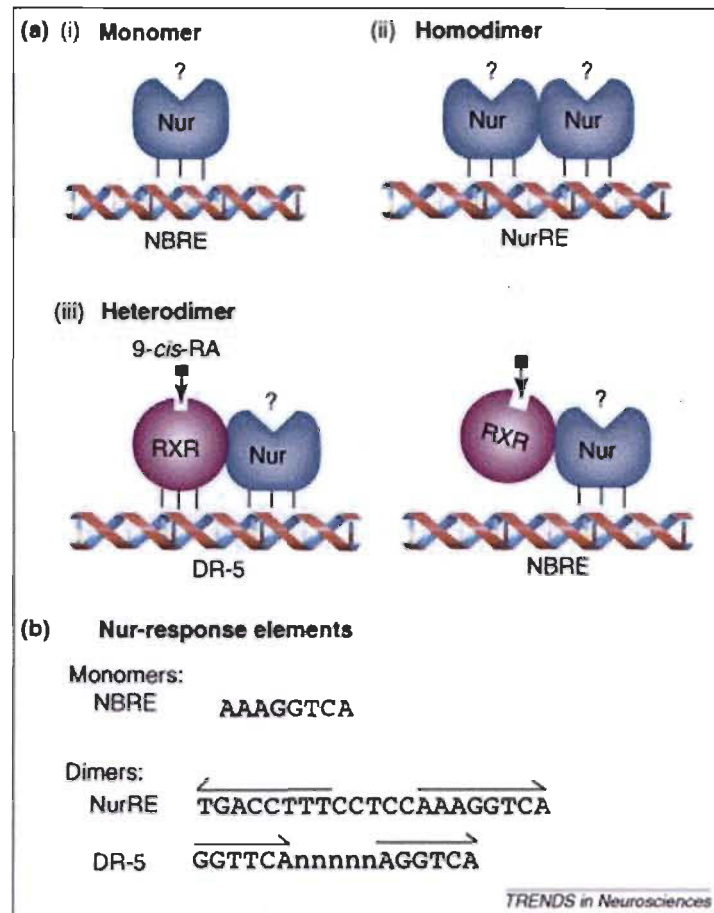


Figure 1.8 : Les différents types de liaison de Nur77 (Levesque *et al.* 2007).

1.5.4 Nur77 et sa liaison avec Bcl-2

La translocation de Nur77 du noyau au cytoplasme favorise une liaison avec la molécule anti-apoptotique appelée Bcl-2 (Moll *et al.* 2006). Bcl-2 est un membre de la grande famille Bcl-2 et est un régulateur essentiel de l'apoptose : un processus biologique important qui élimine les cellules malignes, celles avec l'ADN endommagé ou enfin celles avec un cycle cellulaire aberrant (Reed 1998; Cory *et al.* 2003; Green *et al.* 2004). Tous les membres de la famille de Bcl-2 possèdent un des quatre domaines BH (Reed 1998; Cory *et al.* 2003). Les membres de la famille anti-apoptotique de Bcl-2 (Bcl-2 et Bcl-xL) ont des poches hydrophobes sur leur surface. Ces dernières sont importantes pour leurs fonctions anti-apoptotiques parce qu'elles cachent leur domaine BH3. Par contre, les pro-apoptotiques membres de la famille Bcl-2 exposent leur

domaine BH3 (voir figure 1.9), qui se lie aux poches hydrophobes des anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (par leur domaine BH1, BH2 et BH3) pour inhiber l'effet de survie cellulaire (Moll *et al.* 2006). Le facteur anti-apoptique Bcl-2 peut être converti en une molécule pro-apoptotique par le récepteur nucléaire orphelin Nur77. La liaison hydrophobe entre Nur77 et Bcl-2 permet un réarrangement de la molécule Bcl-2 et lui donne une nouvelle conformation. Cette nouvelle conformation est responsable de la conversion de Bcl-2 de cytoprotective à une molécule cytodestructrice (Moll *et al.* 2006). Durant sa translocation, Nur77 initie la cascade apoptotique par la migration vers les mitochondries où il interagit avec la protéine Bcl-2 en la convertissant de protecteur à tueur (Thompson *et al.* 2008). Le complexe de Nur77 et Bcl-2 (voir figure 1.10) peut être très efficace dans l'induction d'apoptose dans des cellules cancéreuses parce qu'il engage simultanément la suppression de la fonction de survie et l'activation du potentiel pro-apoptotique (Zhang 2007; Sibayama-Imazu *et al.* 2008).

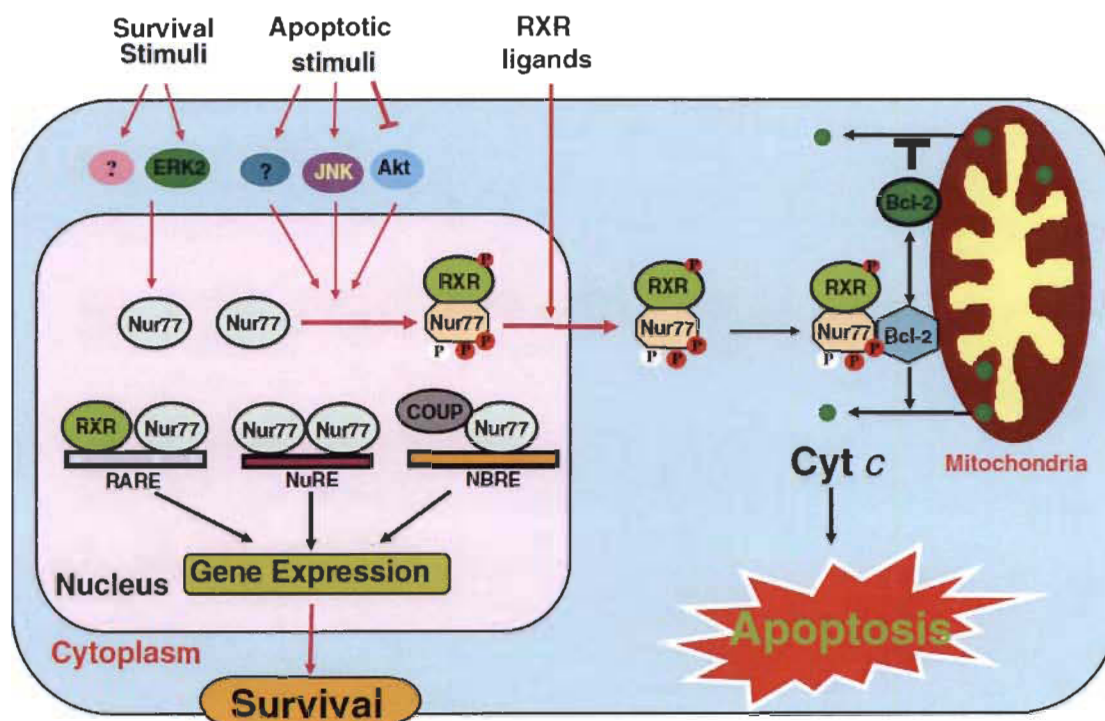


Figure 1.9 : Mécanisme de transcription de l'activité de Nur77 (Moll *et al.* 2006).

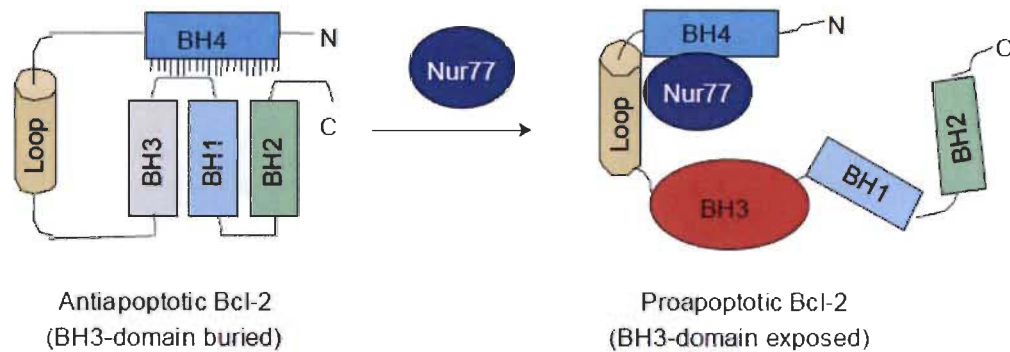


Figure 1.10 : Transformation de Bcl-2 par Nur77. La conformation anti apoptotique est maintenue par un réarrangement de Bcl-2 en exposant son domaine de liaison BH3 : Bcl-2 devient une molécule pro-apoptotique (Zhang 2007).

1.5.5 Nur77 : croissance et apoptose

Bien qu'il reste difficile de savoir comment Nur77 fonctionne comme médiateur d'apoptose, une étude de Li et ses collaborateurs (Li *et al.* 2000) suggère qu'en réponse à certains stimuli apoptotiques, Nur77 subit une translocation du noyau vers la mitochondrie, où il induit la libération du cytochrome c. En revanche, l'effet apoptotique de la transcription de Nur77 est indépendant et se produit en l'absence de son domaine DNAbinding (Jeong *et al.* 2003; Wilson *et al.* 2003; Stasik *et al.* 2007). La translocation de Nur77 du noyau vers la membrane mitochondriale représente un signal initial de mort cellulaire.

1.5.6 Similarité entre Nur77 et p53

En réponse à des stimuli d'apoptose, p53 agit dans le noyau comme facteur de transcription en induisant l'expression de gènes pro-apoptotiques. Par contre, Nur77 est un peu particulier à cause de sa double fonction pro- et anti-apoptotique. Nur77 en tant que facteur de transcription favorise la survie. Dans le cytoplasme, les protéines de p53 et de Nur77 favorisent l'apoptose en ciblant directement les mitochondries et en se liant aux molécules anti-apoptotiques (voir figure 1.11) et forment les complexes suivants :

Bcl-2 (Nur77) et Bcl2/BclxL (p53) (Moll *et al.* 2006). Le gène suppresseur p53 utilise sa liaison avec l'ADN pour se lier en dessous de Bcl-xL et Bcl-2 et par conséquent inhibe leur fonction anti-apoptotique. Nur77 se lie à la région de la boucle de Bcl-2, permettant ainsi un réarrangement structural de Bcl-2 et favorisant ainsi l'exposition de son domaine BH3 (voir figure 1.10). Cette nouvelle configuration transforme Bcl-2 en un tueur et par conséquent déclenche la relâche du cytochrome c et le début d'apoptose. Le résultat final de ces deux cas est l'homo-oligomérisation de Bax et la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Moll *et al.* 2006).

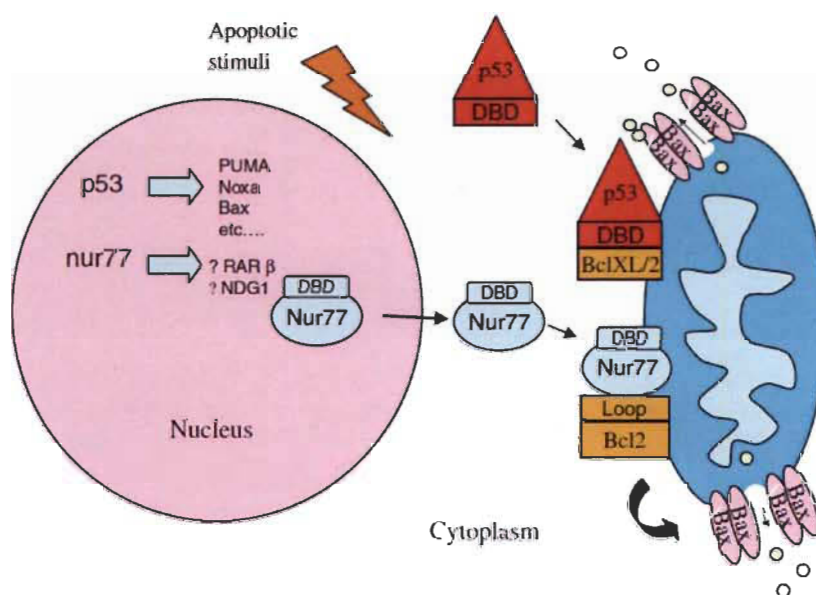


Figure 1.11 : Similarité entre Nur77 et p53 sur la mort apoptotique (Moll *et al.* 2006).

1.6 Stress oxydant

Le stress oxydant est un stress induit par des espèces réactives oxygénées (ROS) « Reactive Oxygen Species » et par les espèces réactives de l'oxyde d'azote « Reactive Oxygen Nitrogen Species » (RONS). Ces espèces sont constituées du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui, en présence de fer (sous forme ionique Fe^{2+}), donne deux radicaux hydroxyle ($\bullet OH$) et le monoxyde d'azote ($NO\bullet$), ou encore les radicaux dérivant d'acides gras insaturés. Il existe des mécanismes cellulaires permettant la détoxification de ces ROS (thiorédoxine), mais lorsque ces systèmes n'arrivent plus à

détoxifier il y a stress oxydant. Des études *post-mortem* ont clairement montré l'implication des dommages provoqués par les radicaux libres dans la pathogenèse de la MP. En particulier, des détériorations au niveau des protéines, des lipides et de l'ADN ont été détectées au niveau de la substance noire des patients (Jenner 2003). Les causes de l'augmentation du stress oxydant dans la MP restent inconnues, cependant l'accroissement du taux de radicaux libres pourrait être expliqué par les dysfonctions mitochondriales (voir figure 1.12), l'augmentation du métabolisme de la dopamine produisant en excès de H_2O_2 et d'autres ROS, l'accroissement du taux d'oxyde ferreux et une diminution de l'efficacité des voies de défense anti-oxydantes (Jenner 2003). Le stress oxydant est considéré comme néfaste pour les neurones, car il favorise la dégénérescence neuronale (voir figure 1.13). En effet, l'inhibition ou une mutation au niveau du complexe-I de la chaîne respiratoire induit une augmentation de la production de radicaux libres. Inversement, une augmentation du stress oxydant induit des dysfonctions mitochondriales (un environnement oxydant).

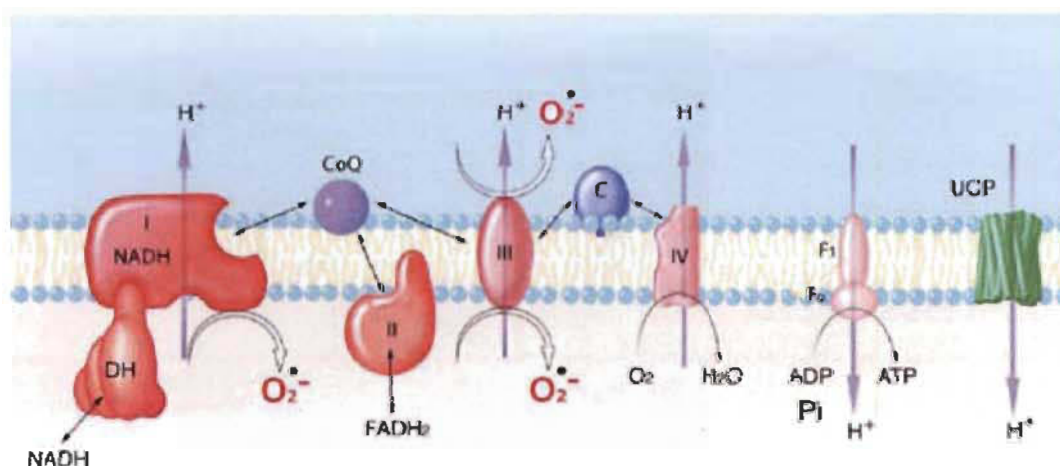


Figure 1.12 : Sites de production de ROS dans la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie (Balaban *et al* 2005).

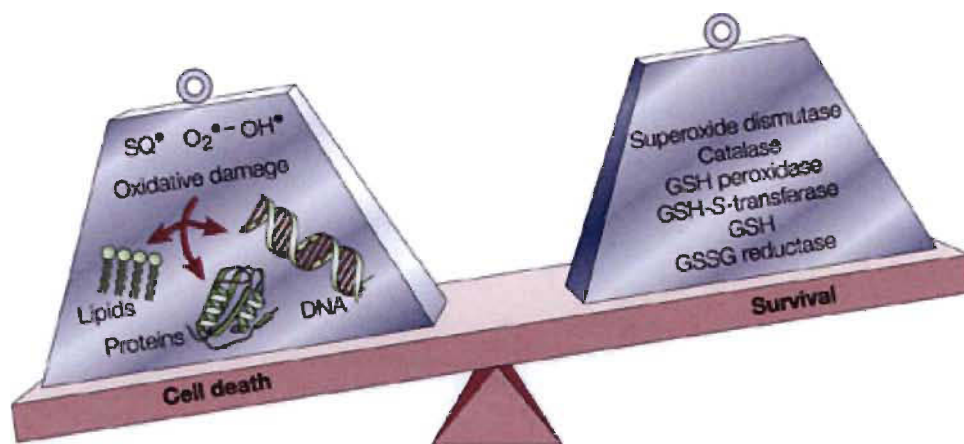


Figure 1.13 : Stress oxydant induit par une rupture d'équilibre entre la production et l'élimination de radicaux libres (Lotharius et Brundin 2002).

1.6.1 Le stress oxydant reproduit expérimentalement par la 6-OHDA

La 6-hydroxydopamine est un analogue hydroxylé de la dopamine isolé pour la première fois en 1959. Son premier effet décrit est la capacité d'induire une déplétion noradrénergique au niveau du système nerveux autonome. Ses potentiels neurotoxiques ont ensuite été démontrés au niveau du système nerveux périphérique. Incapable de traverser la barrière hémato-encéphalique, la 6-OHDA ne peut induire une lésion nigrale chez le rat qu'après une injection stéréotaxique au niveau ventriculaire, directement dans la substance noire ou au niveau du faisceau médian antérieur reliant la substance noire au striatum ou enfin au niveau du striatum (lésion nigrale rétrograde). L'extension de la lésion dopaminergique ainsi engendrée peut être évaluée aisément par l'administration périphérique d'apomorphine ou d'amphétamine qui produit un comportement rotatoire transitoire chez les animaux ayant une lésion unilatérale, comportement pris pour index du degré de dégénérescence neuronale (Gerlach *et al.* 1996). La 6-OHDA permet ainsi de produire dans la substance grise des lésions semblables à celles observées dans la MP. Plusieurs études réalisées sur des préparations de mitochondries isolées démontrent que la 6-OHDA inhibe, d'une manière réversible et indépendamment de la présence du fer, de l'activité et du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Glinka *et al.* 1995). En outre, cette capacité d'inhiber le complexe I semble corrélée au comportement rotatoire induit chez des animaux ayant une lésion unilatérale. D'autres études

démontrent que la neurotoxine est capable d'induire une chute du potentiel membranaire mitochondrial et de provoquer la phosphorylation oxydative d'une manière similaire au dinitrophénol. Néanmoins, des effets mitochondriaux directs sont conditionnés par la capacité de la 6-OHDA d'atteindre cet organite et donc d'entrer dans les cellules dopaminergiques. Finalement, les phénomènes oxydants et mitochondriaux induits par la 6-OHDA aboutissent à de nombreux événements délétères pour les neurones dopaminergiques, les précipitant vers la mort. L'intense stress oxydant provoque des altérations des systèmes de détoxification et du potentiel redox intracellulaire (Kumar *et al.* 1995). Ainsi, *in vivo*, un traitement par la 6-OHDA provoque un accroissement des taux de malonyl-dialdéhyde (Kumar *et al.* 1995) et une diminution des taux de phospholipides ainsi que des lésions de l'ADN mises en évidence par la formation de 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine, de 5-hydroxycytosine et de 2,6-diamino,4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (Bruchelt *et al.* 1991). Les altérations mitochondriales, elles-mêmes productrices des radicaux anions superoxydes, induisent une diminution importante des taux d'ATP intracellulaire. Cela a pour principales conséquences, d'une part, d'altérer le stockage vésiculaire de la dopamine, ce qui provoque une augmentation cytosolique du neurotransmetteur et d'autre part, de perturber la polarisation membranaire (voir figure 1.13), ce qui induit une cytotoxicité indirecte accompagnée d'un dérèglement de l'homéostasie calcique (Brouillet *et al.* 2000).

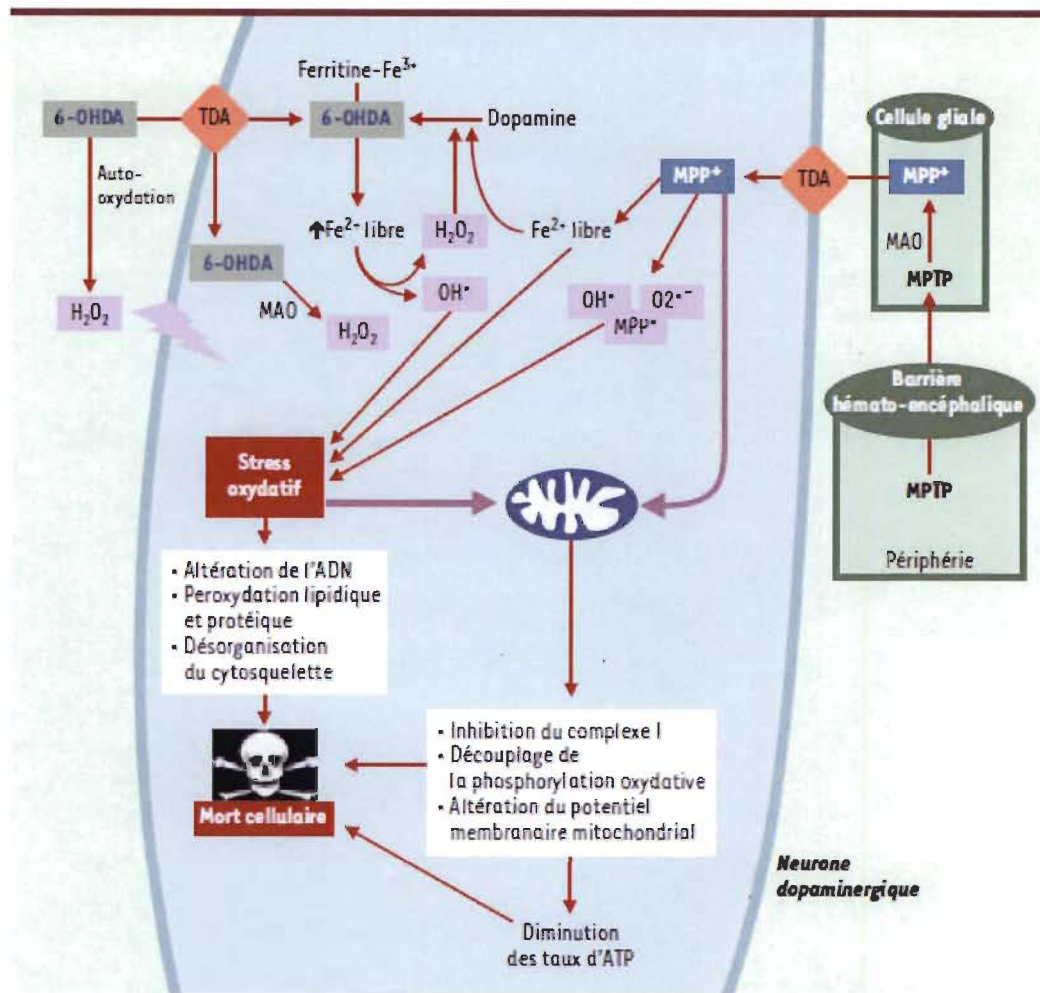


Figure 1.14 : Mécanismes impliqués dans la toxicité de la 6-OHDA et du MPTP (Lambeng *et al.* 2002).

1.7 Apoptose

1.7.1 Définition

L'apoptose est un processus actif et physiologique de mort cellulaire, utilisé pour éliminer les cellules en excès, endommagées ou infectées, potentiellement dangereuses pour l'organisme. L'apoptose joue un rôle essentiel dans le développement normal de l'organisme et dans le maintien de l'homéostasie cellulaire chez l'adulte, de façon opposée à la mitose. La mort cellulaire « normale » a d'abord été observée durant la métamorphose des amphibiens, puis dans plusieurs tissus en développement, tant chez les invertébrés que chez les vertébrés (Weber, 1964; Lockshin *et al.* 2001). L'apoptose

dans divers tissus et types cellulaires a des caractéristiques morphologiques communes, qui sont cependant distinctes de celles observées dans les cellules en nécrose (Kerr *et al.* 1972). Ces auteurs ont suggéré que ces caractéristiques morphologiques communes pouvaient être le résultat d'un programme endogène sous-jacent de mort cellulaire, qu'ils ont appelé « apoptose ». Ce terme vient du grec et fait allusion à la chute des feuilles en automne. Suivant le type de stimuli, la voie apoptotique empruntée sera différente, mais aboutira à l'activation des caspases. L'une de ces voies est dite extrinsèque et fait intervenir des récepteurs transmembranaires. L'autre est dite intrinsèque (voir sous-titre 1.9.3).

1.7.2 Caractéristiques morphologiques de l'apoptose

Une cellule en apoptose active une série d'évènements moléculaires et biochimiques conduisant à des altérations morphologiques. Ces changements morphologiques sont spécifiques à l'apoptose et permettent d'identifier ce type de mort cellulaire. Un des premiers changements observables est la réduction du volume cellulaire. La cellule se déshydrate et cette perte d'eau intracellulaire conduit à la condensation du cytoplasme qui aboutit à une modification de la forme et de la taille de la cellule (voir figure 1.15). Au cours de cette étape, la cellule perd le contact avec ses voisines. Malgré la rétraction cellulaire progressive, les organites intracellulaires restent intacts et gardent leur aspect normal jusqu'à la phase terminale de l'apoptose. Le noyau présente lui aussi des modifications et on assiste à une condensation de la chromatine qui débute à la périphérie de la membrane nucléaire. Puis, cette enveloppe nucléaire se désintègre et la chromatine se fragmente en petites masses distinctes (voir figure 1.16). Après cette phase de condensation, la cellule présente à sa surface des vésicules renfermant des amas de chromatine et des fragments cytoplasmiques, entourés de membrane plasmique. Ces vésicules vont se détacher de la cellule pour former les corps apoptotiques qui sont libérés dans le milieu. Ces corps apoptotiques sont rapidement phagocytés *in vivo*, par les cellules voisines ou les macrophages, sans provoquer d'inflammation dans les tissus environnants. En effet, la formation de corps apoptotiques entourés d'une membrane plasmique intacte prévient le relâchement des constituants

intracellulaires et donc de la réaction inflammatoire. Il existe deux voies principales qui conduisent à l'initiation des événements moléculaires provoquant une mort cellulaire programmée : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque (Reed 2000; Singh *et al.* 2007; Kondo *et al.* 2010).

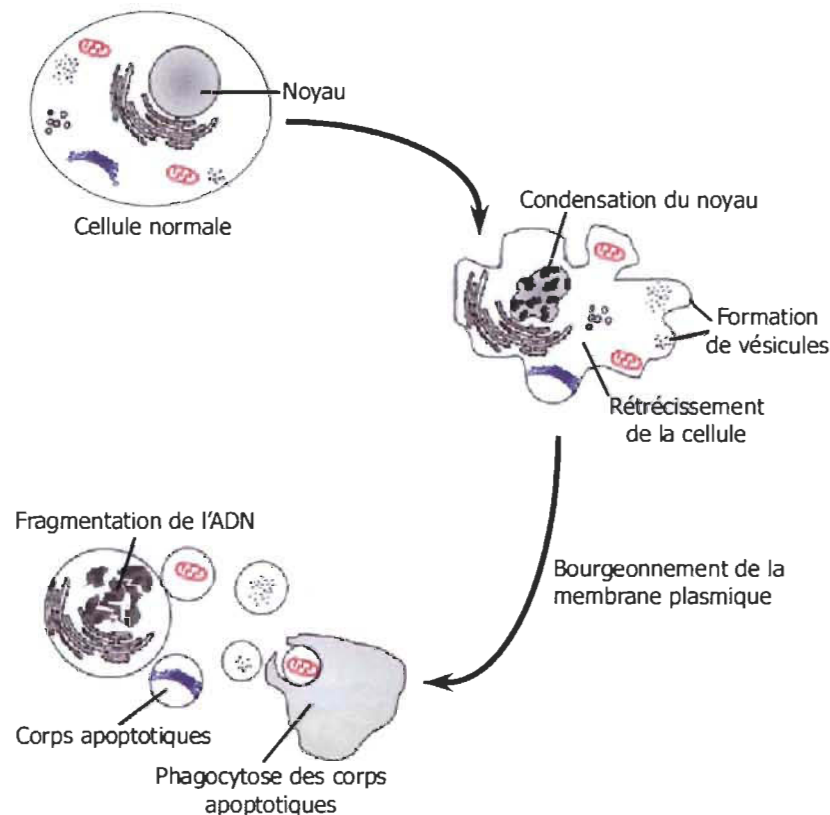


Figure 1.15 : Évolution morphologique d'une cellule en apoptose (<http://www.baclesses.fr/cours/fondamentale/4-division-cellulaire/Divis-i-17.htm>).

1.7.3 Les voies d'apoptose

Suivant le type de stimuli, la voie apoptotique empruntée sera différente, mais aboutira à l'activation des caspases effectrices. L'apoptose par la voie extrinsèque est initiée lors de la fixation de ligands sur les récepteurs de mort de la superfamille des TNFs « tumor necrosis factor » (facteur de tumeur de nécrose). L'autre voie dite intrinsèque implique la mitochondrie ainsi que de nombreux intermédiaires qui ne sont pas représentés sur le schéma ci-dessous. Elle est induite par différents signaux

cellulaires, passe par une cascade moléculaire au niveau de la mitochondrie, impliquant les membres de la superfamille Bcl-2 et aboutissant au relâchement du cytochrome c dans le cytoplasme (Von Ahsen *et al.* 2000; Singh *et al.* 2007). Ces deux voies conduisent à l'activation des caspases effectrices et en particulier la caspase-3 (voir figure 1.15). L'activation des caspases va induire le clivage de leurs nombreux substrats, par exemple PARP-1 qui est une enzyme de réparation de l'ADN (Hong *et al.* 2004).

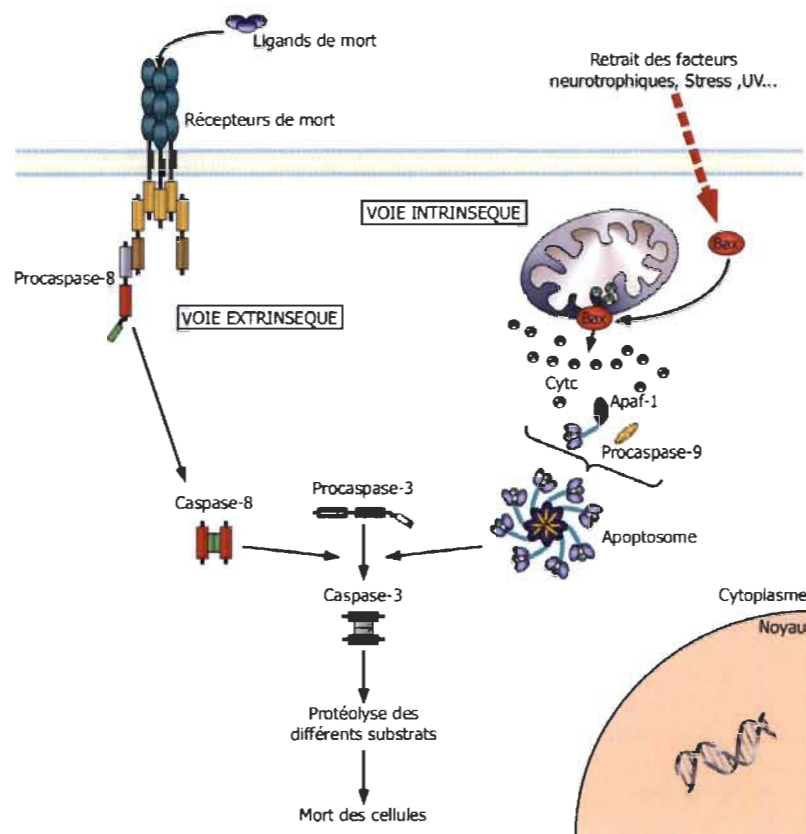


Figure 1.16 : Représentation simplifiée des voies intrinsèque et extrinsèque (Hong *et al.* 2004).

1.7.4 Caractéristiques morphologiques de l'apoptose et de la nécrose

La nécrose se caractérise par le gonflement de la cellule jusqu'à son éclatement alors que l'apoptose se définit par une condensation de la cellule, une fragmentation du noyau et la formation des corps apoptotiques (voir figure 1.17). Contrairement à l'apoptose, au cours de la nécrose, la chromatine n'est pas fragmentée, mais lysée

(karyolysis). La mort cellulaire par nécrose est toujours en grande partie identifiée par des signes négatifs avec l'absence de marqueurs d'apoptose ou d'autophagie, en particulier quand les cellules subissent une perméabilisation précoce de la membrane cellulaire. Bien que les mécanismes et les aspects morphologiques de l'apoptose et de la nécrose diffèrent, dans certaines situations il peut parfois être observé un chevauchement de ces deux processus. (Elmore 2007; Bohrer *et al.* 2009; Kroemer *et al.* 2009).

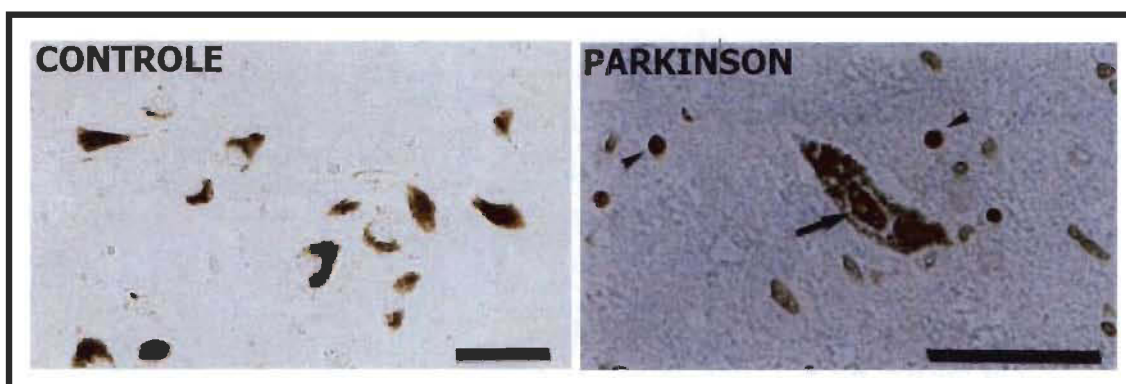


Figure 1.17 : Section de cerveau de patient parkinsonien marqué par TUNEL. Marquage in situ par la méthode TUNEL de l'ADN fragmenté des noyaux des neurones de la substance noire en apoptose (Hirayama *et al.* 1996).

1.8 Les membres de la famille Bcl-2

Les membres de la famille de Bcl-2 (« B-cell leukemia »/« lymphoma 2-like proteins ») sont des protéines intracellulaires essentielles à la régulation de la survie et de l'apoptose. Cette famille est divisée en deux groupes : les protéines possédant une activité anti-apoptotique et celles ayant une activité pro-apoptotique. Leur classification dépend de la présence ou non des domaines BH « Bcl-2 homology ». Quatre domaines BH ont été décrits : BH1, BH2, BH3 et BH4. Les membres de la famille Bcl-2 qui sont anti-apoptotiques (Bcl-2 ou Bcl-XL) contiennent les domaines BH1, BH2, BH3 et BH4. Deux sous-familles des membres pro-apoptotiques ont été identifiées : la sous-famille de Bax (Bax, Bak, Bok) qui contient BH1, BH2 et BH3, et la sous-famille qui possède uniquement le domaine BH3 comme Bid, Bim, Bad, Bik, Bmf (Ashe *et al.* 2003). Les

membres de la famille Bcl-2 régulent la transcription, les événements post-traductionnels des cytokines ou des facteurs de survie ou de mort et les interactions protéines/protéines. L'homodimérisation permet aux protéines de s'activer et l'hétérodimérisation leur permet de s'inhiber. Des phénomènes de modifications post-traductionnelles tels que la phosphorylation ou la protéolyse permettent de réguler l'activité de certains membres de cette famille. Bcl-2 semble être très souvent liée à la membrane mitochondriale, contrairement à d'autres protéines (Bax, Bid, Bad et Bim) qui sont cytosoliques, mais sont transloquées dans la mitochondrie pendant l'apoptose. Ces protéines jouent un rôle important dans la traduction du signal allant du cytosol vers la mitochondrie. La translocation de ces protéines est contrôlée par des modifications post-traductionnelles. Bax est transloquée du cytosol vers la mitochondrie et ce déplacement modifie sa conformation. L'externalisation de son domaine N-terminal permet son insertion au niveau de la membrane externe mitochondriale (Jurgensmeier *et al.* 1998). Cette insertion est suivie par la libération du cytochrome c. L'étude de Rosse et ses collaborateurs (Rosse *et al.* 1998) a montré que Bcl-2 avait également la possibilité d'empêcher l'activation des caspases sans aucun effet sur la libération du cytochrome c. La complexité des protéines de la famille de Bcl-2 conduit à des incertitudes sur leurs rôles exacts dans l'apoptose, mais il est indiscutable qu'elles interviennent dans l'exécution de la mort cellulaire programmée (Ashe *et al.* 2003). En conclusion, les protéines anti-apoptotiques ont pour rôle de protéger la cellule tandis que les protéines de la sous-famille BH3 déclenchent la mort cellulaire par leur fixation aux molécules Bcl-2. Cette fixation aux domaines multiples induira l'inactivation des molécules anti-apoptotiques Bcl-2 ou l'activation des molécules pro-apoptotiques (Joza *et al.* 2002, Kaufmann *et al.* 2001).

1.8.1 Bax

Bax ne contient que les trois domaines BH1, BH2 et BH3. Elle provoque la libération du cytochrome c dans le cytosol et déclenche aussi l'activation de la caspase 3 (Kroemer *et al.* 2000). Seules les protéines à domaine BH3 peuvent transmettre les signaux de mort cellulaire par activation directe ou indirecte de Bax et/ou Bak, qui a leur

tour peuvent induire la perméabilité membranaire mitochondriale externe et libérer des facteurs apoptogènes nécessaires pour activer les caspases (Letai *et al.* 2002; Kuwana *et al.* 2005; Willis *et al.* 2005; Leber *et al.* 2007). Les membres de la famille anti-apoptotique inhibent la mort cellulaire soit en limitant l'activité de Bax, Bak et/ou en séquestrant les membres à un seul domaine BH3.

1.9 Gène suppresseur (p53)

Le gène suppresseur p53 est situé sur le chromosome 17p13.1, il est très conservé au cours de l'évolution et code pour une phosphoprotéine de 393 acides aminés avec un poids moléculaire de 53 kDa. Il joue le rôle de suppresseur de tumeur et de facteur de transcription au niveau du noyau. Dans les cellules neuronales, la surexpression de cette protéine entraîne la mort neuronale. p53 est un facteur de transcription maintenu à faibles taux dans les cellules normales. Par contre, lorsque la cellule est soumise à différents types de stress, p53 est activé (Fridman *et al.* 2003; Haupt *et al.* 2003). Les signaux de stress conduisant à l'activation de p53 sont, par exemple, les dommages à l'ADN (Norbury *et al.* 2004), l'activation d'oncogènes comme *cMyc* (Canman *et al.* 1995) et l'hypoxie (Koumenis *et al.* 2001). Après son activation, p53 va se lier aux promoteurs de certains gènes cibles codant pour des protéines-clés de l'apoptose afin de réguler leur transcription.

1.9.1 p53 une protéine clé impliquée dans les différentes voies apoptotiques

La protéine p53 est avant tout un facteur de transcription possédant de nombreux gènes cibles intervenants dans différents processus cellulaires : réparation de l'ADN cycle cellulaire, angiogenèse et apoptose. Lors d'un stress, la cellule va subir différents dommages en particulier des dommages au niveau de son ADN, p53 est activé pour induire soit, la réparation de l'ADN si cela est possible soit, l'entrée en apoptose de la cellule si les dommages sont trop importants (Liu *et al.* 2000) et la voie intrinsèque est alors sollicitée (Mochizuki *et al.* 1996; Tatton *et al.* 1997; Tatton 2000).

1.9.2 L'importance de l'apoptose et de p53 dans la MP

L'implication de l'apoptose dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques a longtemps été un sujet de controverse, mais depuis quelques années son rôle a été démontré (Damier *et al.* 1999; Hirsch *et al.* 1999; Hartmann *et al.* 2000; Hirsch *et al.* 2000). En effet, grâce à des expériences de TUNEL sur des cerveaux *post-mortem* des parkinsoniens, Mochizuki et ses collaborateurs ont réussi à marquer l'ADN fragmenté et donc à marquer des cellules en apoptose (Mochizuki, *et al.* 1996), ceci fut confirmé par une méthode de double marquage fluorescent (Tatton *et al.* 1998). De plus, les formes actives des caspases-8, -9, -1 et -3 sont présentes en forte quantité dans les cerveaux de patients au niveau de la substance noire, confirmant ainsi l'implication des voies apoptotiques dans la mort des neurones dopaminergiques (Mogi *et al.* 2000; Andersen 2001). Une fois l'apoptose identifiée comme étant le mécanisme impliqué dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques, la question fut de savoir quelles étaient les voies impliquées dans le déclenchement de ce processus. Des études *post-mortem* sur des cerveaux de patients montrent une augmentation du niveau d'expression de la protéine Bax, mais également de Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et de la caspase-3. La GAPDH est une protéine multifonctionnelle impliquée dans la signalisation apoptotique, et en particulier dans la voie p53-GAPDH-Bax (Berry *et al.* 2000; Dastoor *et al.* 2001), ce qui suggère l'implication de la voie mitochondriale (Tatton 2000; Hartmann *et al.* 2001). Cependant, d'autres études *post-mortem* ont également suggéré l'implication des ligands de Fas (FasL), de Fas associé au domaine de mort (FADD) et de la caspase-8. Le taux de ces trois protéines est beaucoup élevé dans les cerveaux de patients parkinsoniens (Mogi *et al.* 1996; Ferrer *et al.* 2000; Hartmann *et al.* 2002). Tout ceci confirme l'implication des voies intrinsèques et extrinsèques dans l'initiation de l'apoptose et dans les mécanismes physiopathologiques de la MP. Comme on vient de le voir, le facteur de transcription p53 est également impliqué dans ces processus puisque la voie p53-GAPDH-BAX est activée *in vivo* afin d'initier l'apoptose (voir figure 1.19). (Tatton *et al.* 2003). En accord avec ces observations, des études *post-mortem* dans les cerveaux de parkinsoniens ont montré une élévation du taux de p53 comparativement à des cerveaux contrôles (Mogi *et al.* 2007). L'implication de la

voie apoptotique dépendante de p53 a également été démontrée dans des modèles cellulaires de MP. En effet, dans des cultures primaires des neurones dopaminergiques soumises à un stress oxydant ou à des inhibiteurs du protéasome, le taux de p53 phosphorylé est augmenté, ce qui est en accord avec des analyses *post-mortem* observés chez des parkinsoniens (Nair 2006; Nair *et al.* 2006). De plus, l'implication de ces voies a également été mise en évidence dans les modèles *in vivo* de la MP (Vila *et al.* 2008).

De façon générale, la conséquence de l'activation de p53 est une inhibition de la croissance cellulaire suite à un arrêt du cycle, ou à travers l'induction de l'apoptose (voir figure 1.18), permettant ainsi d'éviter le développement tumoral de la cellule touchée.

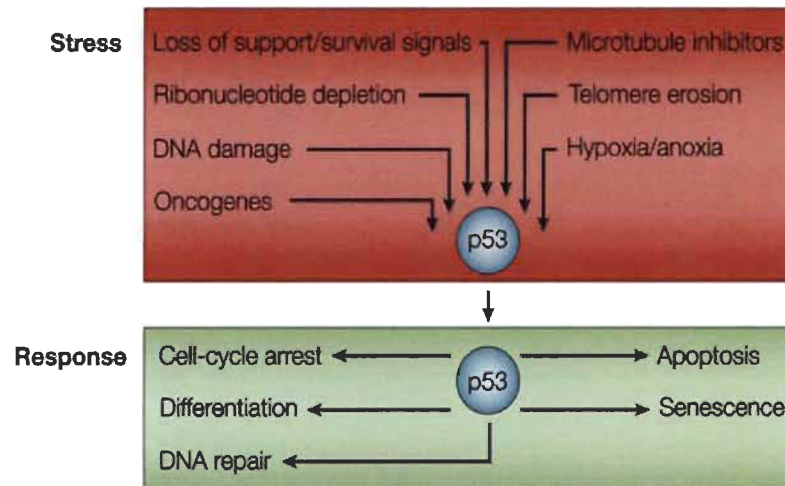


Figure 1.18 : Réponses à l'activation de p53 (Vousden and Lu 2002).

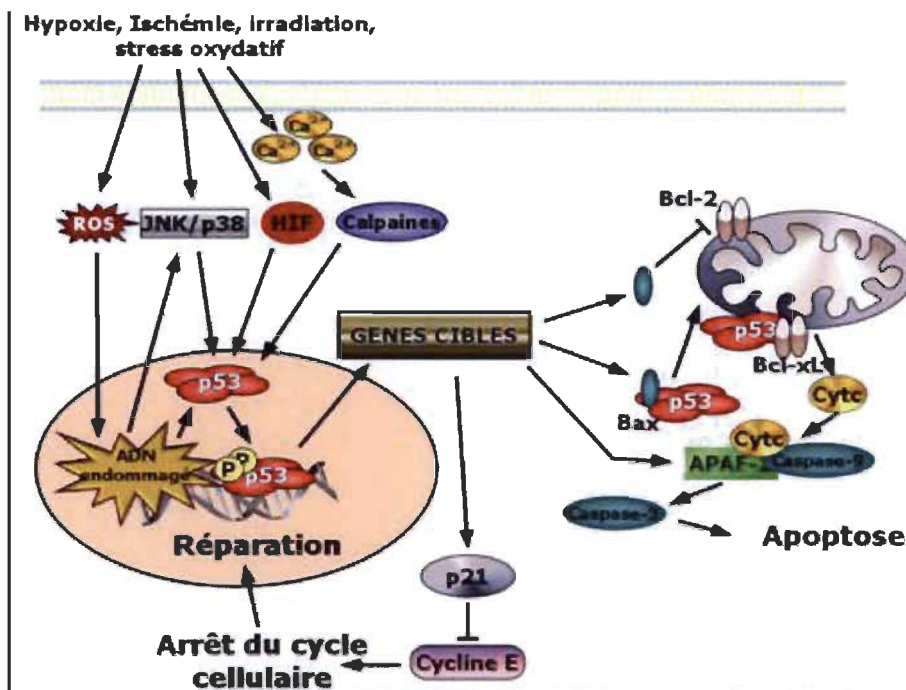


Figure 1.19 : Représentation simplifiée des deux voies pouvant être induites par p53 après un stress
(http://www.unimarburg.de/fb16/pharmtox/gruppen/ag_culmsee).

1.10 Facteur inducteur d'apoptose (AIF)

AIF a été identifié récemment dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Suite à un stimulus apoptotique et une suractivation de PARP-1 (voir section 1.11), AIF se détache de la membrane interne de la mitochondrie pour se localiser dans le cytoplasme et dans le noyau. La protéine AIF a été identifiée par Susin *et al.* (1996). Son gène est situé sur le chromosome X et code pour une protéine de poids moléculaire 57 kDa. AIF est une flavoprotéine constituée de trois domaines : la séquence de signalisation de localisation mitochondriale (MLS) située sur la partie N-terminal, une séquence centrale et un domaine à activité oxydoréductase C-terminal (Lorenzo *et al.* 1999). Le précurseur de l'AIF est synthétisé dans le cytoplasme puis importé dans la mitochondrie (Susin *et al.* 1996), une fois dans l'espace intermembranaire mitochondriale la séquence MLS est clivée, puis la protéine change de conformation. C'est une protéine bi-fonctionnelle ayant probablement une activité oxydoréductase et un rôle pro-apoptotique (Ye *et al.* 2002). Après exposition de la cellule à un stimulus, elle

transloque de l'espace intermembranaire mitochondriale vers le cytosol puis vers le noyau. Ce phénomène précède généralement la libération du cytochrome c. Le mécanisme par lequel AIF transloque vers le cytosol est encore inconnu. Le transport vers le noyau pourrait se faire grâce à une séquence de localisation nucléaire. AIF induit la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN par interaction directe avec l'ADN (Ye *et al.* 2002). Cette interaction se fait surtout par son domaine C terminal. De plus, AIF provoque une perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et donc favorise la libération du cytochrome c et de la pro-caspase-9, grâce à un cofacteur cytosolique (Susin *et al.* 1999). Les effets de AIF sont abolis par la surexpression de Bcl-2 et sont les mêmes dans des cellules ayant ou non des activités de caspase, donc AIF agit indépendamment des caspases. AIF est inhibé par Hsp70 (Ravagnan *et al.* 2001), ceci a été montré *in vitro* par la condensation de la chromatine et *in vivo* au niveau nucléaire et mitochondrial par la surexpression de Hsp70. Beaucoup d'évènements concernant l'AIF sont encore inconnus, notamment son mode d'action sur l'ADN, son activité d'oxydoréductase et la transduction du signal permettant sa libération. La condensation de l'ADN observée lors de l'apoptose pourrait être expliquée par l'interaction directe de l'AIF sur l'ADN. En effet, cette interaction pourrait modifier la structure de la chromatine et favoriser l'action des nucléases.

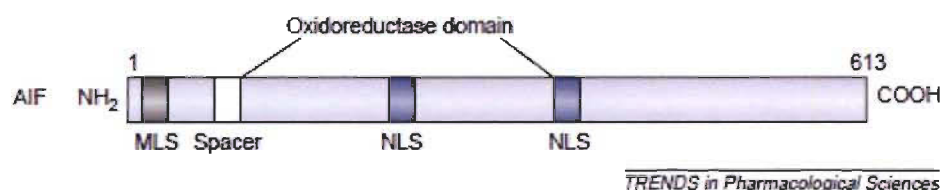


Figure1.20 : Structure primaire du facteur inducteur d'apoptose
 MLS : signal de la localisation mitochondriale, NLS : signal de localisation nucléaire (Hong *et al.* 2004).

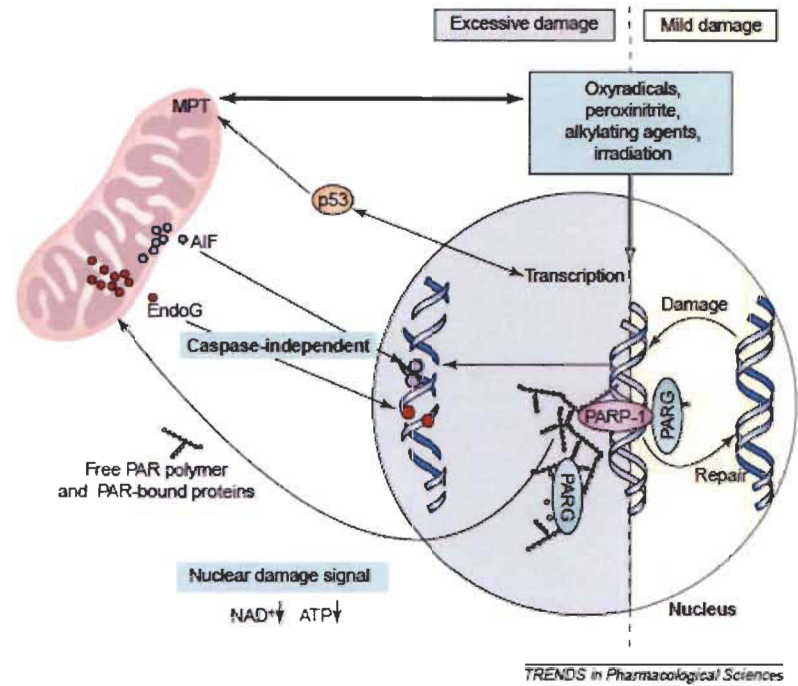


Figure 1.21 : Libération de AIF (Hong *et al.* 2004).

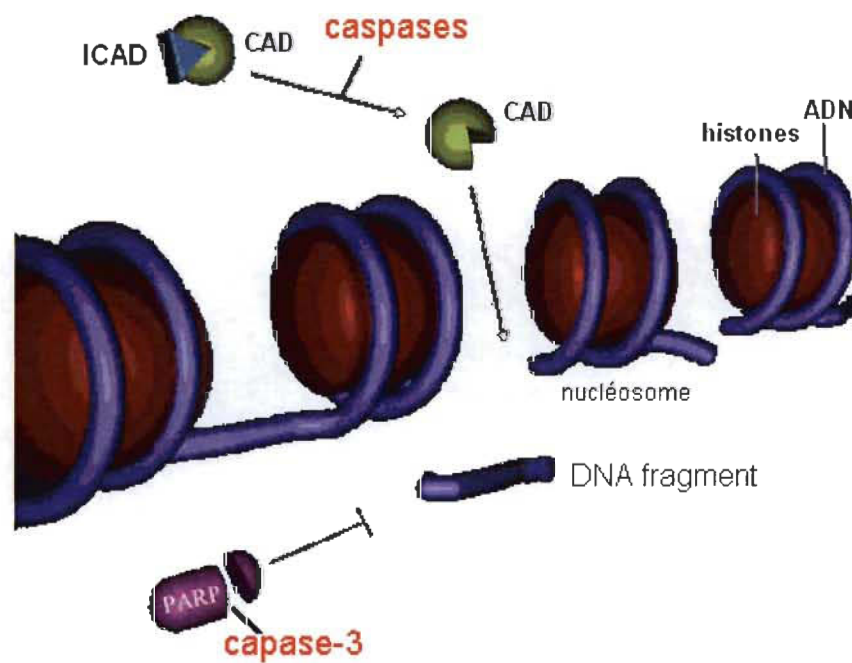


Figure 1.22 : Étape finale de l'apoptose : fragmentation d'ADN.

1.11 Poly (ADP-ribose) polymérase (PARP-1)

La poly (ADP-ribose) polymérase (PARP-1) aussi appelée poly (ADP-ribose) synthétase est une enzyme réparatrice d'ADN et modificatrice de protéine, présente en abondance dans le noyau. Il appartient à une grande famille de protéines qui comprend PARP-2, PARP-3 (Smith 2001). Chaque membre de la famille partage une homologie de PARP sur le domaine C-terminal catalytique de PARP-1. En moyenne, une molécule de PARP-1 est présente pour chaque 1000 pb d'ADN. En réponse aux dommages de l'ADN, l'activité de PARP-1 augmente rapidement jusqu'à 500 fois lors de la liaison avec le brin d'ADN. PARP-1 transfère 50-200 résidus de PAR à lui-même et aux accepteurs de protéines tels que les histones, l'ADN polymérase, les topoisomérases, l'ADN ligase-2, les groupes de protéines de haute mobilité et le facteur de transcription (Shall *et al.* 2000; Smulson *et al.* 2000). PARP-1 joue un rôle important dans la réparation de l'ADN, mais peut aussi conduire à la mort cellulaire par la réduction de la quantité cellulaire du nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) (Sato *et al.* 1992; Endres *et al.* 1997). PARP-1 est activé quand il vient s'attacher à la région de l'ADN endommagé. L'auto modification de PARP-1 favorise son relâchement de l'ADN, permettant ainsi la fixation des enzymes de réparation sur les sites de l'ADN endommagé. Durant l'apoptose, PARP-1 est clivé d'une manière spécifique par les protéases de la famille des ICE (exemple caspase-3). Il est aussi converti en un fragment de 85 KDa avec une activité minimale qui n'est pas activée par l'ADN endommagé. Des recherches récentes suggèrent que le petit fragment contenant le domaine de liaison à l'ADN du PARP-1 clivé peut entraver l'accès des enzymes de réparation (Smulson *et al.* 1998). La localisation du fragment de 85 kDa (PARP-1 clivé) dans le nucléoplasme au cours de l'apoptose favorise la modulation de l'activité d'autres protéines impliquées dans l'apoptose telle que p53 (Nicholson *et al.* 1995; Alvarez-Gonzalez *et al.* 1999). Des expériences ont démontré que l'inhibition de PARP-1 prévient les dommages des tissus chez des modèles animaux présentant des ischémies neuronales, des diabètes, et des accidents vasculaires cérébraux (Eliasson *et al.* 1997; Curtin 2005).

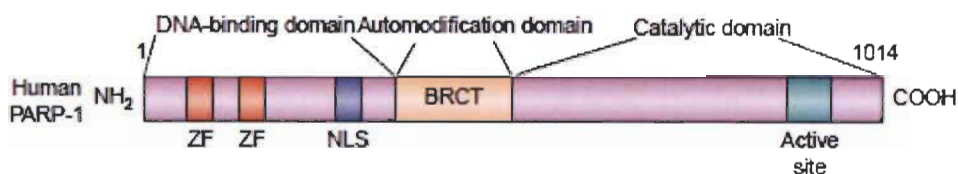


Figure 1.23 : Structure primaire de PARP-1

ZF : zinc finger motif, NLS : signal de localisation nucléaire, BRCT : abréviation du domaine C-terminal. *TRENDS in Pharmacological Science* (Hong *et al.* 2004).

1.12 Leptomycine B

La leptomycine B (Andersen *et al.*) est un puissant anti-fongique. Elle a été découverte et purifiée à partir du bouillon de fermentation et le mycélium des *Streptomyces* (Hamamoto *et al.* 1983; Yoshida *et al.* 1990). La LMB (C33H48O6, PM 540) est un acide gras non saturé à chaîne ramifiée avec un cycle lactone terminal. Récemment, cet antibiotique est devenu un outil important pour l'étude de localisation nucléaire dans les cellules eucaryotes, dû à l'inhibition spécifique de la voie d'exportation nucléaire (complexe CRM1/exportin1).

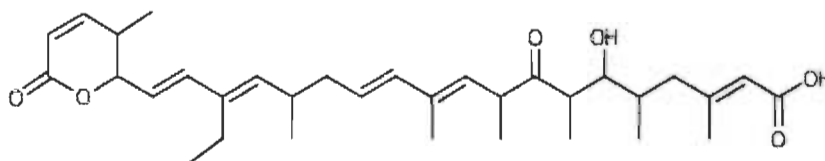


Figure 1.24 : Structure chimique de la leptomycine B.

1.12.1 Mécanisme d'action de la LMB

La LMB forme un complexe covalent avec le groupe conservé du sulfhydryl. Toutefois, des données récentes ont montré que la LMB présente deux différentes fonctions telles que l'arrêt du cycle cellulaire G1 dans les cellules de mammifères et enfin elle est aussi considérée comme un puissant agent anti-tumorale contre les tumeurs sur des cellules expérimentales (Komiya *et al.* 1985; Yoshida *et al.* 1990). Des études faites sur le *Scizosaccharomyces pombe* ont identifié le CRM1 (maintenance de la

région chromosomique) comme la cible cellulaire de la LMB (Nishi *et al.* 1994), ce qui est essentiel pour l'exportation de l'ARN et des protéines contenant une séquence d'exportation nucléaire (NES). Dans le cas de l'exportation de l'ARN, CRM1 se lie à la protéine ribonucléique contenant une séquence d'exportation nucléaire (Wolff *et al.* 1997; Watanabe *et al.* 1999).

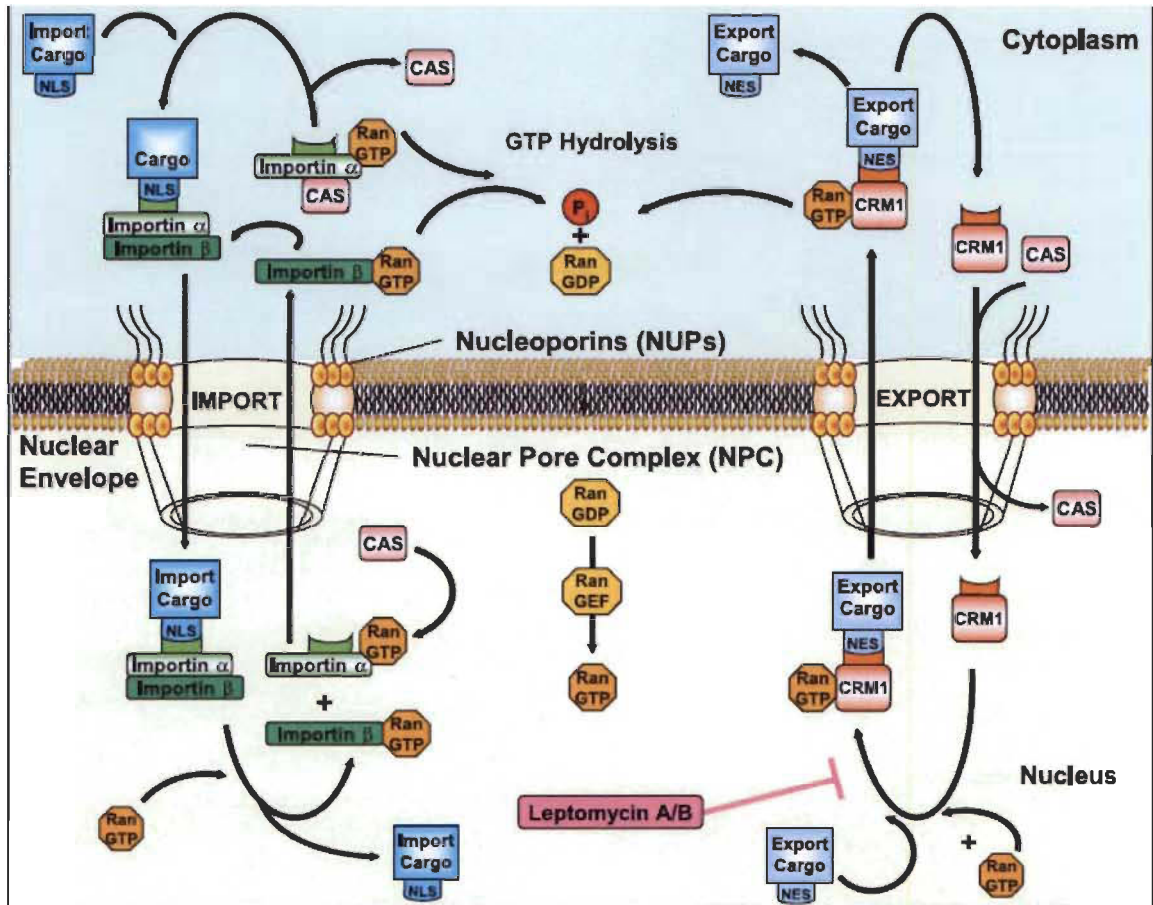


Figure 1.25 : Mécanisme d'action de la LMB
(<http://www.axxora.com>).

1.13 Objectif du mémoire

L'objectif principal de ces travaux de recherche était de bloquer la translocation de Nur77 du noyau au cytoplasme grâce à une substance antifongique appelée LMB et ensuite vérifier son effet sur les facteurs apoptotiques. Enfin pour compléter notre étude nous avons vérifié si la LMB avait un effet protecteur sur les cellules PC12.

Ce projet de recherche nous a permis de mieux comprendre les mécanismes de mort cellulaire par apoptose induits par une toxine parkinsonienne, la 6-OHDA, et pourra aider dans le futur au développement des stratégies neuroprotectrices.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Culture cellulaire

Pour l'étude d'une maladie neurodégénérative telle que la MP, nous avons choisi d'utiliser comme modèle cellulaire des PC12 (American Type Culture Collection, ATCC), une lignée cellulaire provenant d'un phéochromocytome de la surrenale de rat. Ces cellules sont dites catécholaminergiques puisqu'elles produisent de la dopamine, de la noradrénaline et de l'adrénaline. En plus, avec l'ajout du NGF, les PC12 cessent de se diviser, développent des prolongements et par conséquent, elles adoptent un nouveau phénotype d'où l'appellation cellules différenciées neuronales.

Toutefois, tous nos travaux ont été effectués avec des cellules PC12 non différenciées encore appelées PC12 naïves (voir figure 2.1) parce que l'expression de Nur77 est induite par le NGF. En utilisant les cellules différenciées, il serait difficile de faire la différence entre expression de Nur77 constitutive et expression de Nur77 induite par NGF.

Les PC12 ont été cultivées dans une atmosphère humidifiée à 37°C contenant 5 % de CO₂. Le milieu de culture utilisé était le RPMI-1640 sans rouge phénol contenant 5 % de sérum bovin, 10 % de sérum de cheval, 15 µg/mL de pénicilline G et 25 µg/mL de streptomycine. Les PC12 ont été cultivées dans des flacons de 75 cm² à une concentration de 45 000 cellules/cm². Nous avons effectué le changement de milieu de culture tous les deux jours et les cellules étaient à confluence sept jours après chaque passage. Les flacons et les plaques utilisées pour la culture cellulaire étaient enduits avec du collagène 0.01 % toute la nuit. Le milieu de culture était conservé au frigo et maintenu à un pH physiologique (de 7.1 à 7.3).

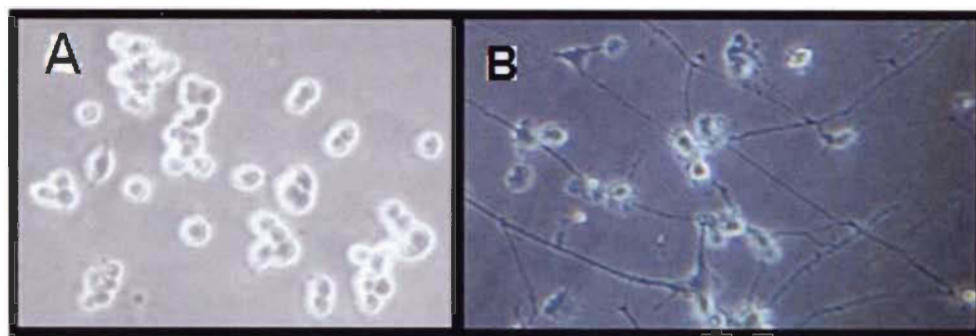


Figure 2.1 : Cellules PC12 : A : PC12 naïves, B : PC12 différenciées.

2.2 Traitement des cellules

Les PC12 ont été cultivées dans les plaques de 6 ou de 96 puits à une concentration de 100 000 cellules par cm^2 . Vingt-quatre heures après la mise des cellules en culture, nous avons effectué des traitements avec la 6-OHDA à une concentration de 30 $\mu\text{M}/\text{mL}$ pendant 0, 6, 9 et 24 heures. Pour vérifier l'effet de la LMB sur les cellules PC12, nous avons effectué un pré-traitement d'une heure avec la LMB à une concentration de 10^{-9} M/L suivi du traitement avec la 6-OHDA. Le milieu de traitement utilisé est le RPMI 1640 sans rouge phénol avec 1 % de FBS « strippé ». Le caractère « strippé » signifie que les stéroïdes présents dans du FBS ont été éliminés à l'aide du charbon, afin d'éviter leur interférence avec nos résultats. Tous les traitements ont été effectués 24 heures après la mise des cellules en culture. La LMB a été dissoute dans de l'éthanol à une concentration de 10^{-6} M/L aliquoté et conservé à -20°C .

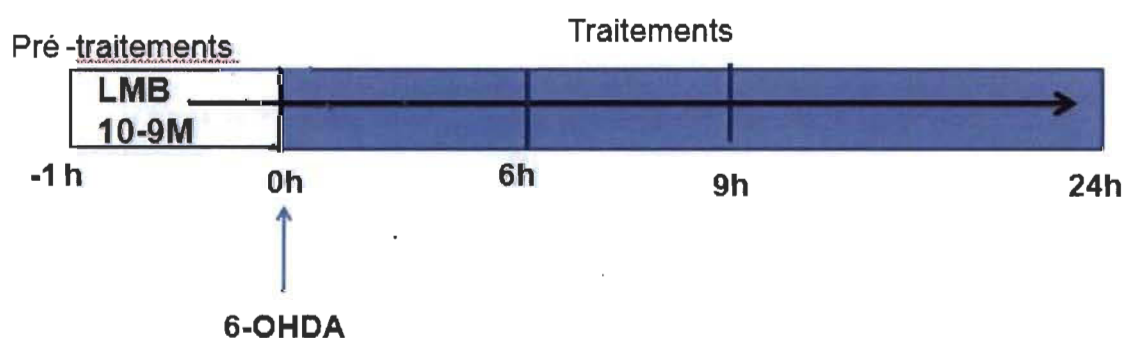


Figure 2.2 : Stratégie pour l'élaboration des traitements des cellules.

À la fin de nos traitements, nous avons fait les tests de cytotoxicité et d'immunobuvardage de type Western.

2.3 Test de cytotoxicité

Afin d'évaluer l'effet neuroprotecteur sur les PC12, nous avons utilisé une trousse de détection de la cytotoxicité. Il s'agit d'un test colorimétrique utilisé, pour quantifier la mort cellulaire, basé sur la mesure de l'activité du lactate déshydrogénase (LDH). La LDH est une enzyme cytoplasmique relâchée dans le surnageant par une cellule morte ou endommagée. Il est donc possible de quantifier la mortalité cellulaire par le dosage de l'activité enzymatique de la LDH présente dans le surnageant. Dans notre cas, les cellules PC12 ont été cultivées dans des plaques de 96 puits, ce qui permet de faire plusieurs répétitions d'un même traitement. Pour chaque condition, un minimum de quatre répétitions a été effectué. Suite au traitement des cellules avec la LMB et/ou la neurotoxine, 50 μ L de surnageant a été prélevé dans chacun des puits. Le surnageant contient une quantité de LDH qui est proportionnelle à la mortalité cellulaire. En effet, plus il y a de mortalité cellulaire, plus la LDH est relâchée dans le surnageant. L'activité de la LDH dans le surnageant a été dosée à l'aide d'un test enzymatique qui se fait en deux étapes distinctes (voir figure 2.2) : dans la première étape, le NAD^+ est réduit en NADH/H^+ par la conversion de l'acide lactique en acide pyruvique par la LDH. La deuxième étape est caractérisée par la conversion du sel de tétrazolium (jaune) en sel de formazan (Van Soom *et al* 1999.). On peut ainsi quantifier la quantité de formazan formée au cours de la réaction qui est proportionnelle au nombre de cellules lysées. La figure 2.2 est un schéma explicatif de la réaction colorimétrique.

À la fin de chaque traitement, 50 μ L de surnageant ont été prélevés et mis dans une plaque de 96 puits, suivi d'un ajout de 100 μ L du mélange de réactif et le tout incubé à l'obscurité pendant 15 minutes. La mesure de l'absorbance a été faite par un lecteur de microplaque (Multiscan Ascent Microplate Reader, Thermolab) à une longueur d'onde de 492 nm. La mortalité maximale (Abs_{max}) a été obtenue à partir des puits traités avec un détergent (triton X-100) de concentration 0,1 % qui perméabilise

toutes les membranes alors que la mortalité de base (Abs_{base}) a été obtenue à partir des puits contenant juste les cellules et le milieu de traitement. L'absorbance mesurée est proportionnelle au nombre de cellules mortes et le pourcentage de mort cellulaire a été obtenu à l'aide de l'équation suivante (2.1) :

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{(Abs_{exp} - Abs_{base})}{(Abs_{max} - Abs_{base})} \times 100 \quad (2.1)$$

Formule pour le calcul de la cytotoxicité

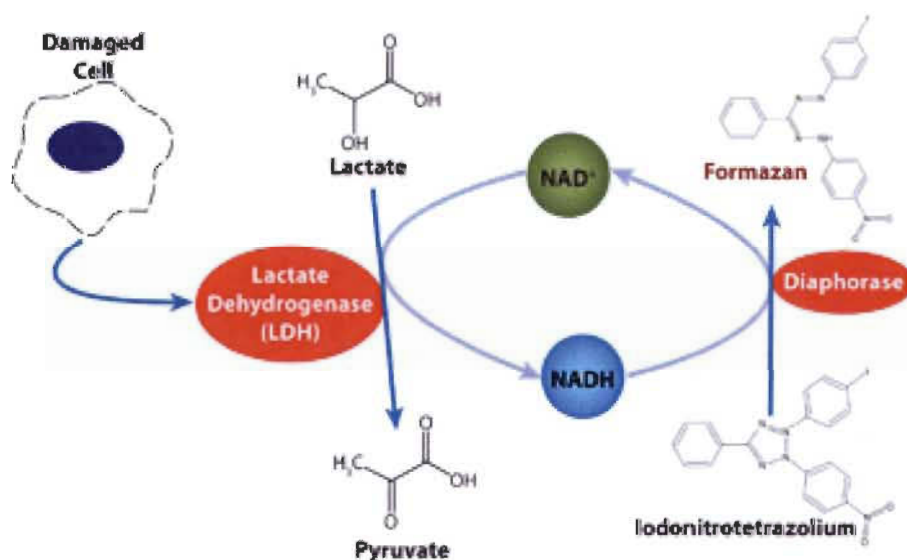


Figure 2.3 : Schéma des réactions enzymatiques impliquées dans le test de cytotoxicité.

2.3 Extraction des protéines

Le « Nuclear extract kit » de Active Motif (Carlsbad, CA), nous a permis d'extraire les protéines totales, cytoplasmiques et nucléaires. La concentration protéique a été déterminée par le BCA « protein assay kit ».

2.3.1 Extraction des protéines cytoplasmiques et nucléaires

Les cellules ont été décollées et transférées dans des tubes de 1,5 mL et centrifugées (3 200 rpm) pendant cinq minutes. Ensuite, le surnageant a été enlevé et le culot a été resuspendu dans un mélange de solution de PBS et d'inhibiteur des phosphatases afin de limiter les modifications protéiques. Après une centrifugation de cinq minutes, le culot a été de nouveau suspendu dans un tampon hypotonique et incubé pendant 15 minutes sur la glace afin de fragiliser les membranes et l'ajout de 25 μ L du détergent doux a provoqué la rupture des membranes et la libération des protéines dans le surnageant. Après centrifugation, le surnageant recueilli a été appelé protéines cytoplasmiques. Le culot a été lavé avec 200 μ L de mélange de solution de PBS et d'inhibiteur des phosphatases et centrifugé de nouveau pendant cinq minutes pour éliminer toutes les traces de protéine cytoplasmique. Le culot a été suspendu dans 50 μ L du tampon de lyse complet (dithiotreitol, tampon de lyse AM1, cocktail d'inhibiteurs de protéase) et les tubes ont été incubés sur la glace pendant 30 minutes sur une plaque agitatrice. Après centrifugation, le surnageant (fraction nucléaire) a été recueilli.

2.3.2 Extraction de la protéine totale

À la fin des traitements, les cellules ont été décollées, transférées dans des tubes de 1,5 mL et centrifugées pendant cinq minutes. Ensuite, le surnageant a été enlevé et le culot a été resuspendu dans un mélange de solution de PBS et d'inhibiteur des phosphatases afin de limiter les modifications protéiques. Après une centrifugation de cinq minutes, le culot a été suspendu dans 50 μ L du tampon de lyse complet (dithiotreitol, tampon de lyse AM1, cocktail d'inhibiteurs de protéase) et les tubes ont été incubés sur la glace pendant 15 minutes sur une plaque agitatrice ensuite centrifugés pendant 20 minutes. Le surnageant obtenu après centrifugation a été appelé protéine totale.

2.3.3 Immunobuvardage de type Western

L'évaluation de la modulation des protéines de Nur77, Bcl-2, Bax, AIF, p53 et PARP-1 a été faite à l'aide de la technique d'électrophorèse et d'immunobuvardage de type Western. Les protéines ont été diluées dans un tampon contenant du β -mercaptoéthanol, du sodium dodécyl sulfate (SDS) et ensuite chauffées à 95 °C pendant cinq minutes pour dénaturer les protéines. La même quantité de protéines (20 μ g) a été chargée dans des puits d'un gel de polyacrylamide 10 %. Après la séparation électrophorétique à 120 V pendant 90 minutes, les protéines ont été transférées sur une membrane de polyvinylidène difluoré (PVDF) avec des pores de 0,22 μ m à 60 V pendant deux heures. Pour minimiser les sites d'interactions non spécifiques entre la membrane et l'anticorps, les membranes ont été bloquées avec une solution de lait en poudre non gras 5 % dilué dans du TBS-T pendant une heure à température pièce (TP). Ensuite, les membranes ont été incubées sur une plaque agitatrice avec l'anticorps primaire (voir tableau 2.1). Après trois lavages au TBS-T, les membranes ont été incubées avec l'anticorps secondaire anti-lapin conjugué à la peroxydase diluée 1/10000 pendant deux heures à TP. Les anticorps primaires ont été dilués avec 0,5 g de BSA et 25 mg de sodium azide dilué dans du TBS-T. La solution d'anticorps secondaire a été faite avec du lait en poudre 5 % dilué dans du TBS-T. Les bandes des protéines ont été visualisées à l'aide de l'appareil Fluor Chem (Alpha Innotec, San Leandro, CA). L'analyse de l'intensité moyenne des bandes a été effectuée à l'aide du logiciel ImageJ. Afin de confirmer la bonne séparation des protéines cytoplasmiques et nucléaires, les membranes ont été « strippées » c'est-à-dire que nous avons enlevé le lien du premier anticorps et nous avons utilisé un autre anticorps sur la même membrane, ceci nous permet de tester plus d'un anticorps sans toutefois faire des nouvelles extractions. Le stripage se fait pendant 15 minutes avec une solution de Re-Blot Plus Strong 1x (Millipore Billerica, MA). Après blocage avec du lait 5 %, les membranes sont incubées avec les anticorps anti-TH (protéine présente exclusivement dans le cytoplasme) et anti-HDAC1 (protéine présente exclusivement dans le noyau) pour s'assurer qu'il n'y a pas de protéine nucléaire dans la fraction cytoplasmique et aussi qu'il n'y a pas de protéine cytoplasmique dans la fraction nucléaire.

Tableau 2.1
Les anticorps utilisés avec leur dilution

Anticorps primaires	Dilution avec la solution d'anticorps primaires
Anti-Nur77	1/250
Anti-Bcl-2	1/100
Anti-Bax	1/50
Anti-p53	1/200
Anti-AIF	1/200
Anti-PARP-1	1/75
Anti-TH	1/2000
Anti-HDAC-1	1/250

2.4 Analyse statistique

Les différences statistiques entre les groupes étaient déterminées avec le logiciel GraphpadInstat3 avec le test ANOVA, une voie suivie d'un post test Bonferroni. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- S.E.M, à partir d'au moins trois expérimentations différentes. Les moyennes associées à des symboles sont statistiquement différentes du contrôle ou de la condition LMB-6-OHDA respectivement, lorsqu'elles sont accompagnées d'une étoile (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$) ou d'un rond (⁰ $P < 0.05$; ⁰⁰ $P < 0.01$; ⁰⁰⁰ $P < 0.001$).

* : Les astérisques expliquent la différence entre le contrôle et le traitement à la 6-OHDA respectivement.

0 : Le rond explique la différence entre le traitement à la 6-OHDA et le pré-traitement à la LMB suivi du traitement à la 6-OHDA.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

Tous les graphiques présentés dans ce mémoire ont été obtenus à partir de la moyenne d'au moins trois expérimentations. Cependant, pour ne pas alourdir celui-ci, les bandes du Western représentent seulement les résultats d'une seule expérience.

3.1 Effets de la LMB sur la translocation de Nur77

Tout d'abord, j'ai voulu vérifier l'effet de la 6-OHDA sur la translocation de Nur77 du noyau au cytoplasme. En nous référant aux résultats de Western blotting obtenus dans notre laboratoire qui montrait que la translocation de Nur77 du noyau au cytoplasme se fait 9 heures après le traitement avec la 6-OHDA (Cindy Tremblay données non publiées), nous avons choisi d'effectuer des traitements pendant 0, 6, 9 et 24 heures. La figure 3.1 montre qu'en traitant les PC12 avec la 6-OHDA, nous avons observé que déjà 6 heures après le traitement il y avait une augmentation de l'expression de Nur77 dans la fraction nucléaire (23 %). Par contre à 9 heures il y avait une translocation de Nur77 caractérisée par une diminution de l'expression de Nur77 dans le noyau (45 %) et une augmentation dans la fraction cytoplasmique (53 %). En plus, dans cette même condition il y'avait une augmentation du ratio cyto/nuc de 1.7 comparé au ratio cyto/nuc du temps zéro. Comparé au contrôle, la condition 24 heures ne présentait pas des résultats statistiquement différents. Cependant, en faisant un pré-traitement avec la LMB suivi d'un traitement à la 6-OHDA, nous avons noté pour la condition 6 heures une augmentation de l'expression de Nur77 (17 %) dans la fraction nucléaire. Ensuite, la condition 24 heures présentait une diminution de l'expression de Nur77 dans la fraction cytoplasmique et nucléaire (40 %). Enfin, c'était très intéressant de noter que le pré-traitement à la LMB bloquait la translocation de Nur77 et par conséquent, diminuait très significativement le ratio cyto/nuc de la condition 9 heures comparé au ratio obtenu avec le traitement à la 6-OHDA du même temps (voir figure 3.1).

La figure 3.2 démontre que la LMB toute seule n'a aucun effet sur la modulation de l'expression de Nur77.

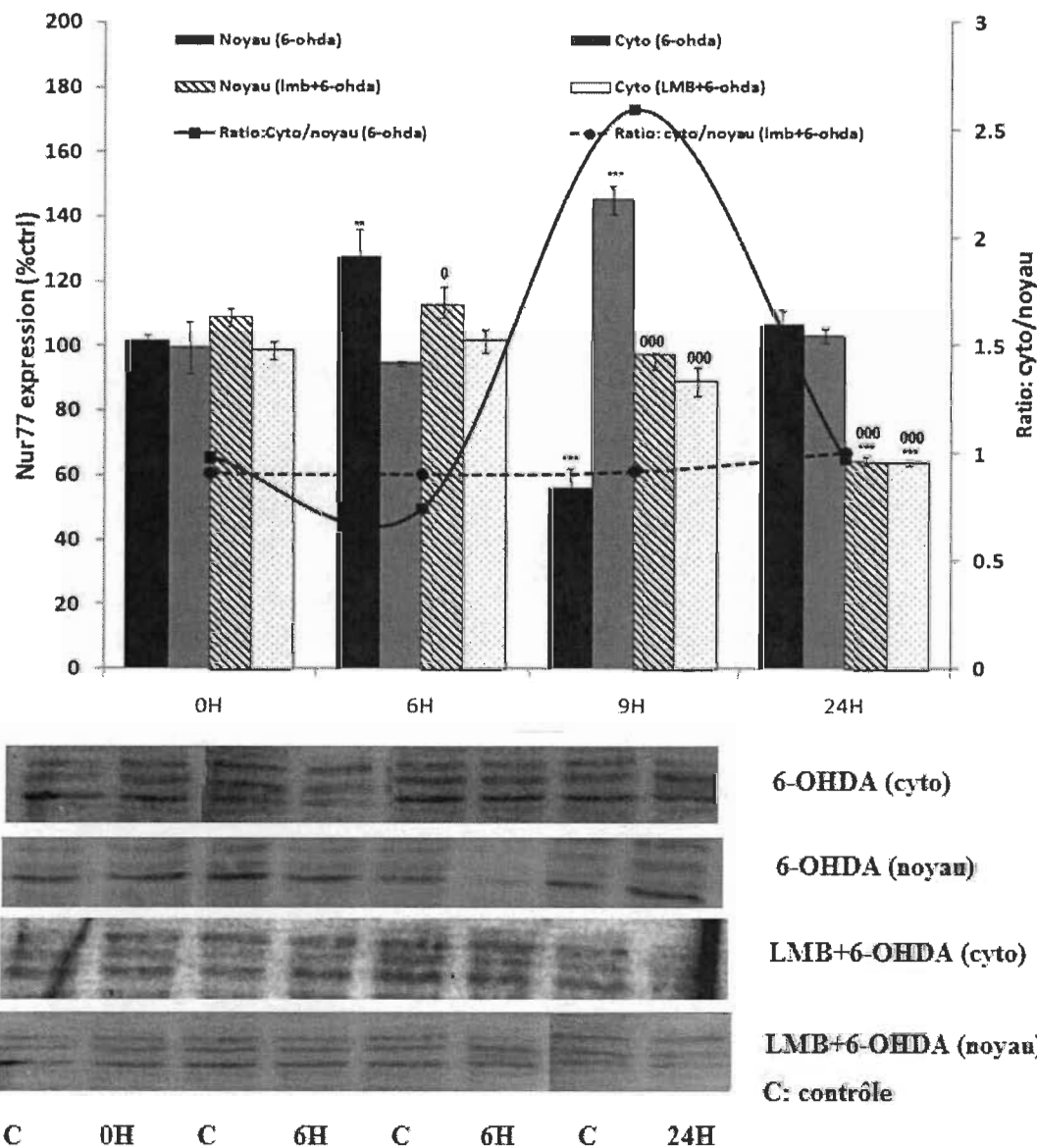


Figure 3.1 : Modulation de l'expression de Nur77 dans le noyau et dans le cytoplasme suite au traitement à la 6-OHDA avec ou sans pré-traitement à la LMB. L'analyse de l'expression de la protéine Nur77 a été faite en considérant les trois bandes visibles ci-dessus, puisque Nur77 phosphorylé présente trois différentes bandes (Davis *et al.* 1993; Han *et al.* 2006). n=3 *P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001 vs contrôle et ⁰P<0.05; ⁰⁰⁰P<0.001 vs 6-OHDA.

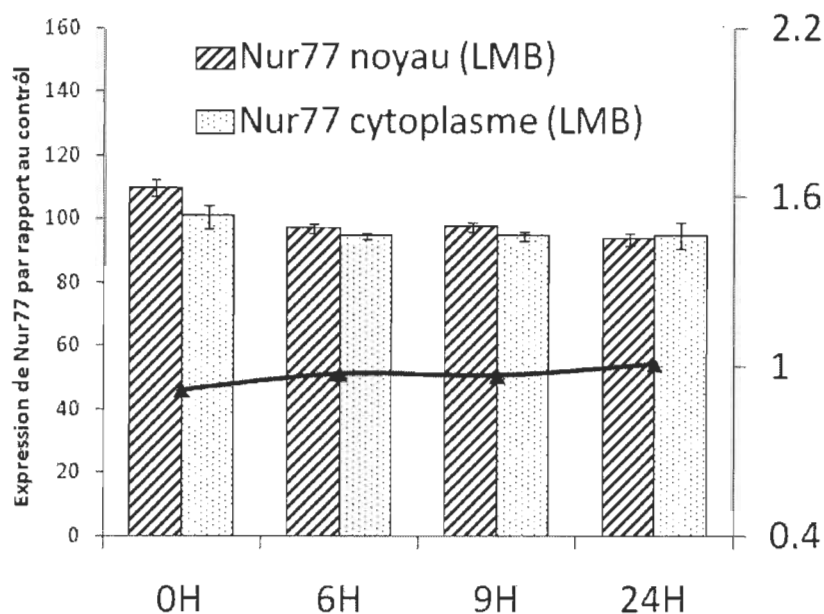


Figure 3.2 : Effet de la LMB sur la translocation de Nur77 du noyau au cytoplasme.

3.2 Effet neuroprotecteur de la LMB sur la toxicité induite par la 6-OHDA

En mesurant l'activité de la LDH, nos résultats démontrent qu'en administrant 30 μ M de 6-OHDA pendant 0, 6, 9 et 24 heures sur des cellules PC12, nous avons observé qu'à 6 heures, il y avait environ 8 % de mort cellulaire, 14 % pour la condition 9 heures et 45 % pour la condition 24 heures. Le pourcentage de cytotoxicité obtenu à 24 heures est comparable aux résultats obtenus précédemment dans notre laboratoire. En parallèle, en faisant un pré-traitement d'une heure avec la LMB, nous avons noté que la LMB toute seule était un peu toxique pour les cellules PC12 à 24 heures, mais ce taux de mortalité n'était pas statistiquement différent comparé au contrôle. L'analyse de nos résultats a démontré qu'en faisant un pré-traitement d'une heure suivi du traitement à la 6-OHDA, il y avait une diminution significative de la toxicité cellulaire comparé aux résultats obtenus par l'induction de la 6-OHDA seule (voir figure 3.3). Ce qui nous a permis de conclure que la LMB avait un effet neuroprotecteur, lorsqu'administré avec la 6-OHDA.

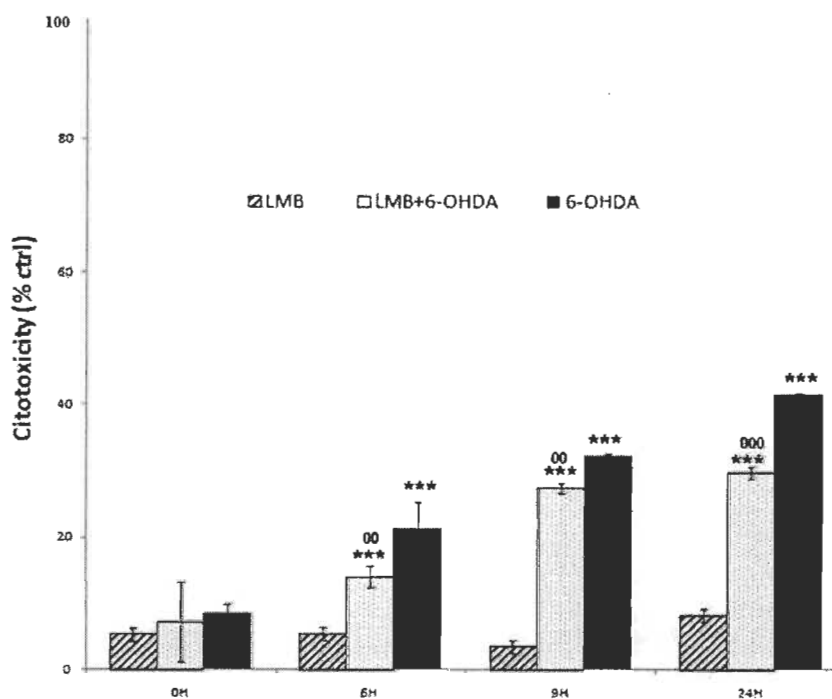


Figure 3.3 : Mesure de la mort cellulaire par la technique de la LDH après traitement à la 6-OHDA avec ou sans pré-traitement avec la LMB. n=3 * * * P<0.001 vs contrôle ⁰⁰P<0.01; ⁰⁰⁰P<0.001 vs 6-OHDA.

3.3 Modulation de l'expression de la protéine Bax/Bcl-2

Le test d'immunobuvardage de type western nous a permis d'évaluer la modulation des protéines Bax et Bcl-2. Les résultats de la figure 3.4 démontrent que sous l'effet de la 6-OHDA ou du pré-traitement avec la LMB suivi du traitement avec la 6-OHDA, la modulation de l'expression de Bax et Bcl-2 ne diffère pas statistiquement pour les temps 0, 6 et 9 heures. Cependant, 24 heures après le traitement avec la 6-OHDA, nous avons noté une diminution d'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (53 %) et pas d'effets sur la protéine Bax. Cette grande diminution de Bcl-2 a provoqué une augmentation du ratio Bax/Bcl-2 de 1,2 fois comparé aux autres temps. L'analyse des résultats de la figure 3.4 démontre aussi qu'un pré-traitement avec la LMB suivi du traitement avec la 6-OHDA ne présente pas d'effets sur la modulation de Bax, mais crée une augmentation de la protéine Bcl-2 de presque 50 % comparé à la condition 6-OHDA, ce qui provoque une diminution du ratio Bax/Bcl-2 de 1.1. Donc, nous pouvons dire que la LMB a un effet sur la modulation de la protéine Bcl-2 et par

conséquent a un effet anti-apoptotique (voir figure 3.4). En se référant à la figure 3.5, il est à noter que la LMB seule n'a aucun effet sur la modulation de la protéine de Bax et Bcl-2.

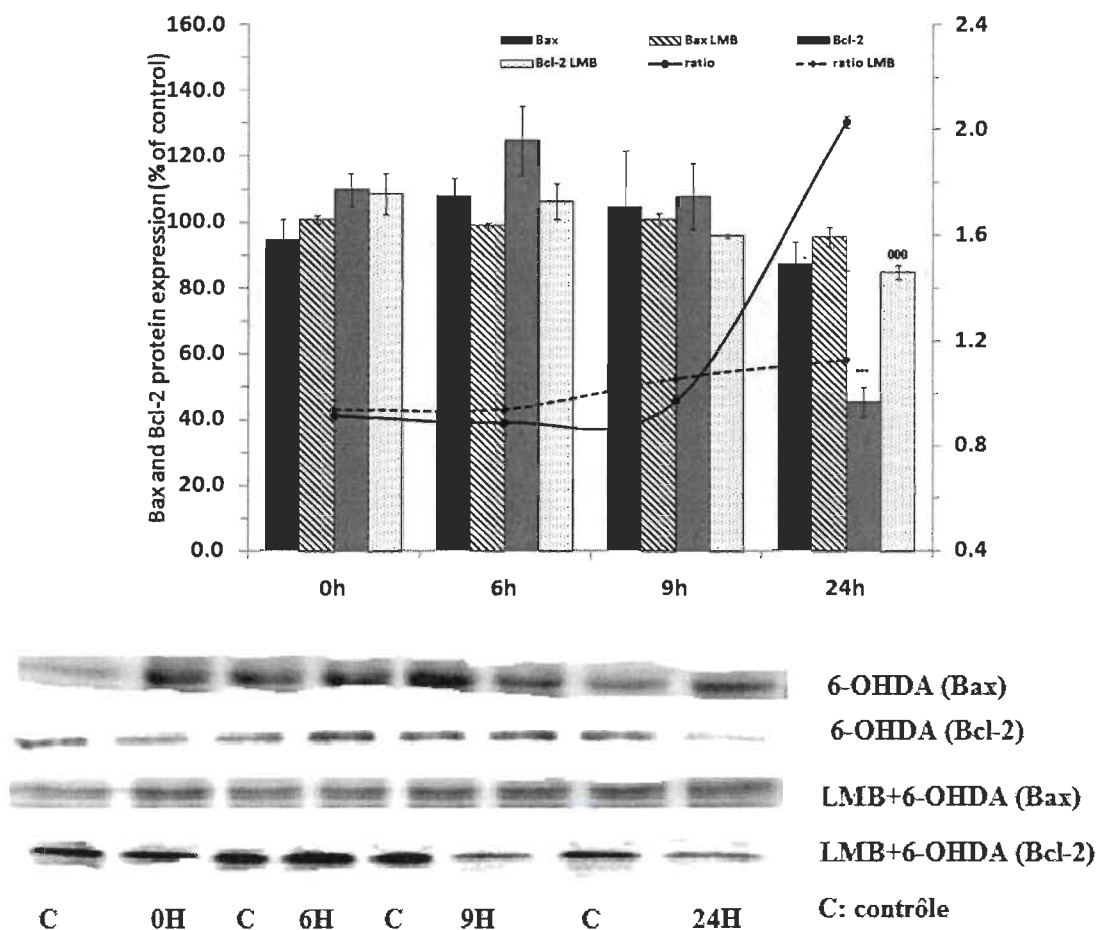


Figure 3.4 : Effet de la modulation de l'expression Bax et Bcl-2 suite au traitement à la 6-OHDA avec ou sans pré-traitement avec la LMB. n=3 * * * P<0.001vs contrôle et ⁰⁰⁰P<0.001 vs 6-OHDA.

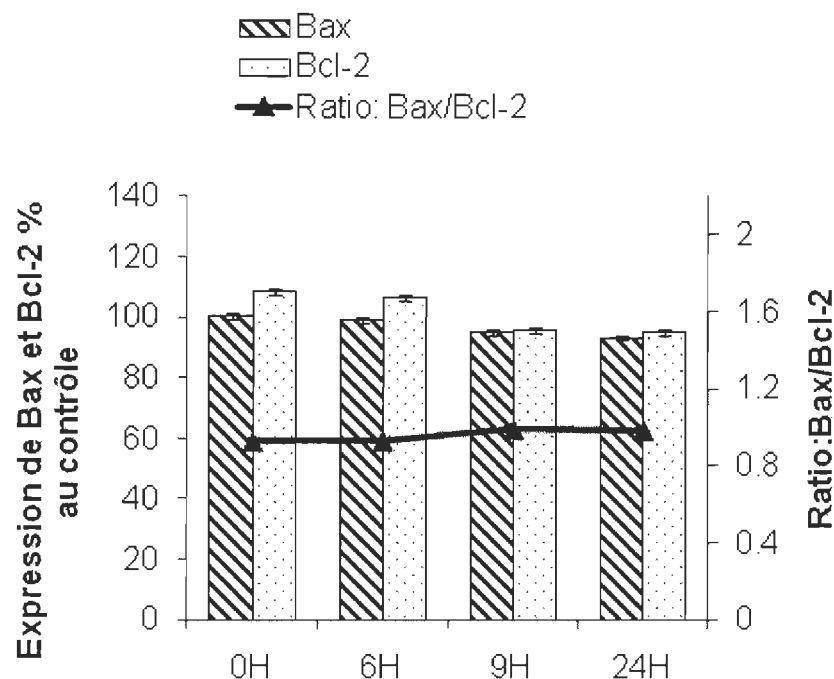


Figure 3.5 : Effet de la LMB sur la modulation de Bax/Bcl-2.

3.4 Modulation de l'expression du gène suppresseur p53

La figure 3.6 montre que l'administration de la 6-OHDA seule ou combinée avec la LMB n'a pas d'influence sur la modulation de l'expression du gène suppresseur p53 pour les temps 0, 6 et 9 heures. Cependant 24 heures après le traitement à la 6-OHDA, il y a une augmentation d'environ 38 % d'expression de la protéine p53. Par contre, le pré-traitement d'une heure à la LMB suivi d'un traitement à la 6-OHDA présente 35 % de diminution de l'expression de p53 comparé à la condition 6-OHDA. La LMB a donc un effet sur la modulation de la protéine p53. La figure 3.7 démontre que la LMB toute seule n'a pas d'effets sur la modulation de la protéine p53.

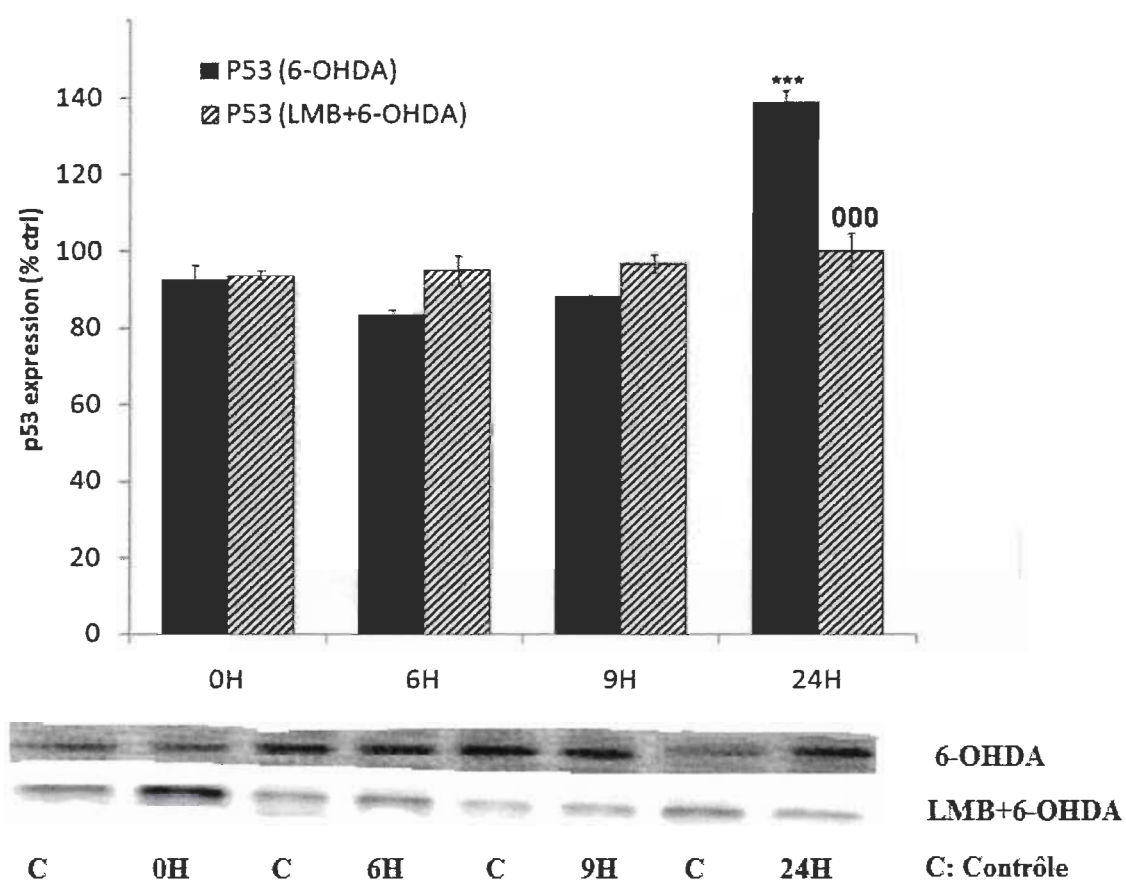


Figure 3.6 : Modulation du gène suppresseur p53 suite au traitement avec la 6-OHDA, avec ou sans LMB.
 $n=3$ * * * $P<0.001$ vs contrôle et 000 $P<0.001$ vs 6-OHDA.

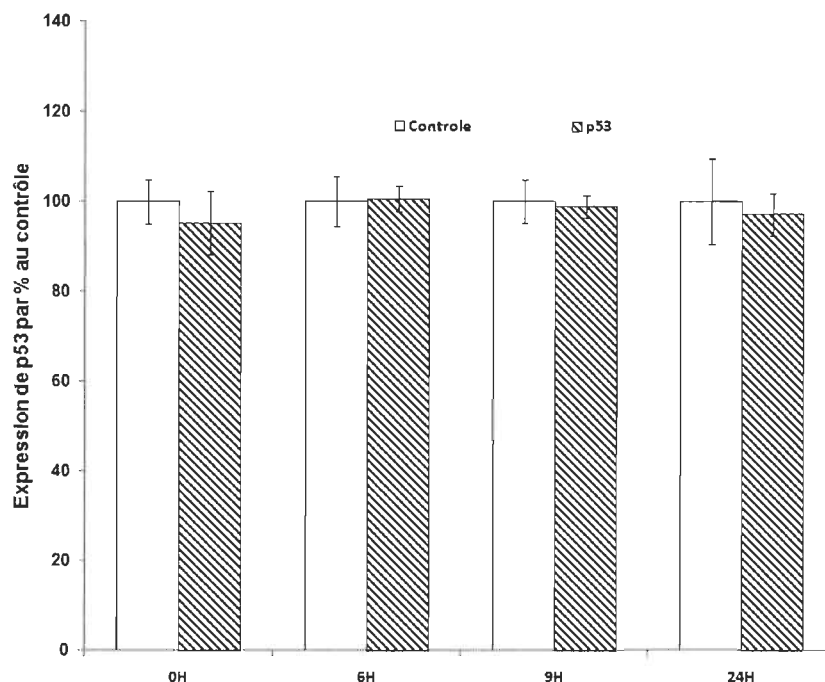


Figure 3.7 : Effet de la LMB sur la modulation de p53.

3.5 Étude de la translocation de AIF des mitochondries vers le noyau

Nous avons étudié la translocation de AIF des mitochondries vers le noyau après l'administration de la 6-OHDA et avec l'addition de la LMB ou non (voir figure 3.8). L'administration de la 6-OHDA pendant 0, 6, 9 et 24 h nous a permis d'observer une translocation de AIF des mitochondries vers le noyau seulement 24 heures après le traitement. Pour les conditions 0, 6 et 9 heures et pour les deux types de traitements, il n'y avait pas de translocation de AIF. La figure 3.8 démontre que l'induction de la 6-OHDA provoque une augmentation de 48 % dans le noyau et une diminution de 29 % dans les mitochondries. Cependant pour cette même condition, un pré-traitement à la LMB suivi d'un traitement à la 6-OHDA ne présentait pas des résultats différents comparés aux résultats obtenus avec le traitement à la 6-OHDA seulement. De plus en se référant aux résultats de la figure 3.9, nous avons noté que la LMB seule n'avait aucune influence sur la translocation de AIF. Donc, la LMB n'a aucun impact sur la translocation de AIF induite par la 6-OHDA.

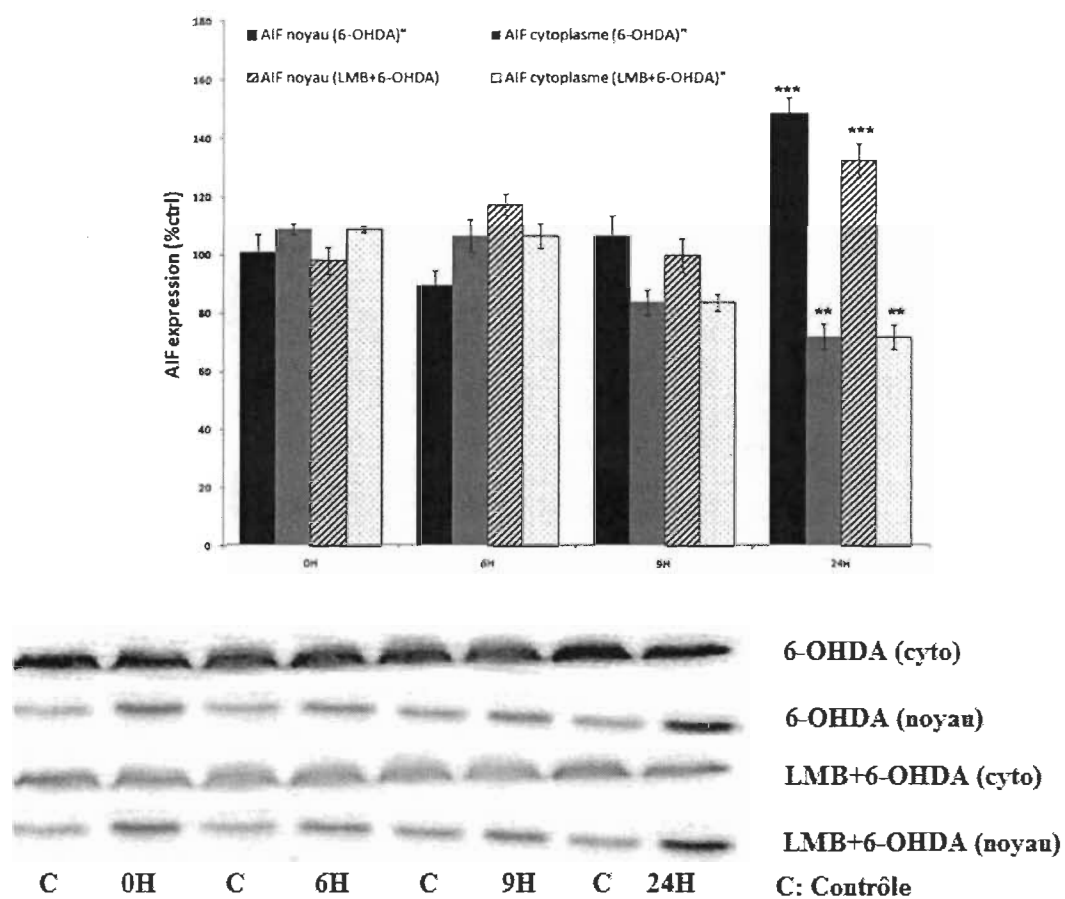


Figure 3.8 : Effet de la modulation de la protéine AIF après traitement à la 6-OHDA avec ou sans pré-traitement à la LMB.
 n=3 ** P<0.01; *** P<0.001.

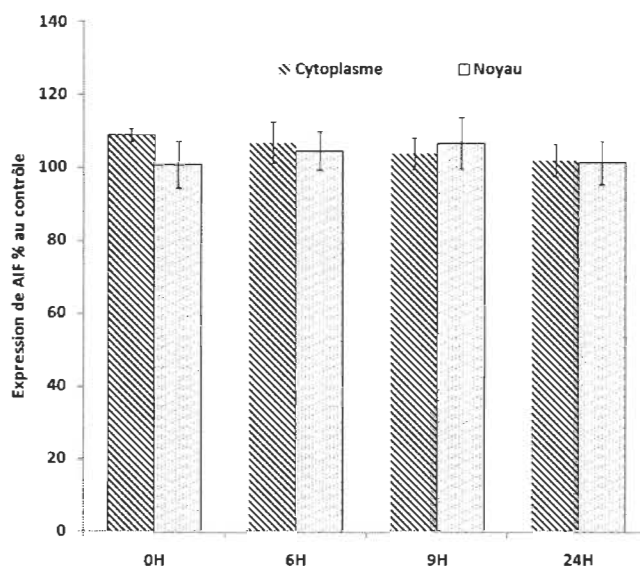


Figure 3.9 : Effet de la LMB sur la modulation de AIF.

3.6 Modulation de l'expression du Poly (ADP-ribose) polymérase (PARP-1)

Enfin, nos résultats démontrent qu'en traitant les PC12 avec la 6-OHDA, avec ou sans un pré-traitement à la LMB, on observe, à 6 heures, une augmentation de 18 % et 12 % respectivement pour les deux types de traitements. Par contre, pour les deux types de traitements en étude, la condition 9 heures ne présentait pas des résultats statistiquement différents en comparaison avec la condition contrôle. Cependant, pour la condition 24 heures, nous avons observé que la 6-OHDA diminue l'expression de PARP-1 d'environ 35 % comparé au contrôle. Par contre, un pré-traitement à la LMB suivi d'un traitement avec la 6-OHDA présente une diminution d'expression de PARP-1 d'environ 30 % (voir figure 3.10). En se référant à la condition 24 heures, nous avons noté que la LMB n'a pas une influence significative sur la modulation de la protéine PARP-1, donc la LMB n'a pas d'effets sur la modulation de la protéine PARP-1. La figure 3.11 montre encore une fois que la LMB toute seule n'a aucun effet sur la modulation de l'expression la protéine PARP-1.

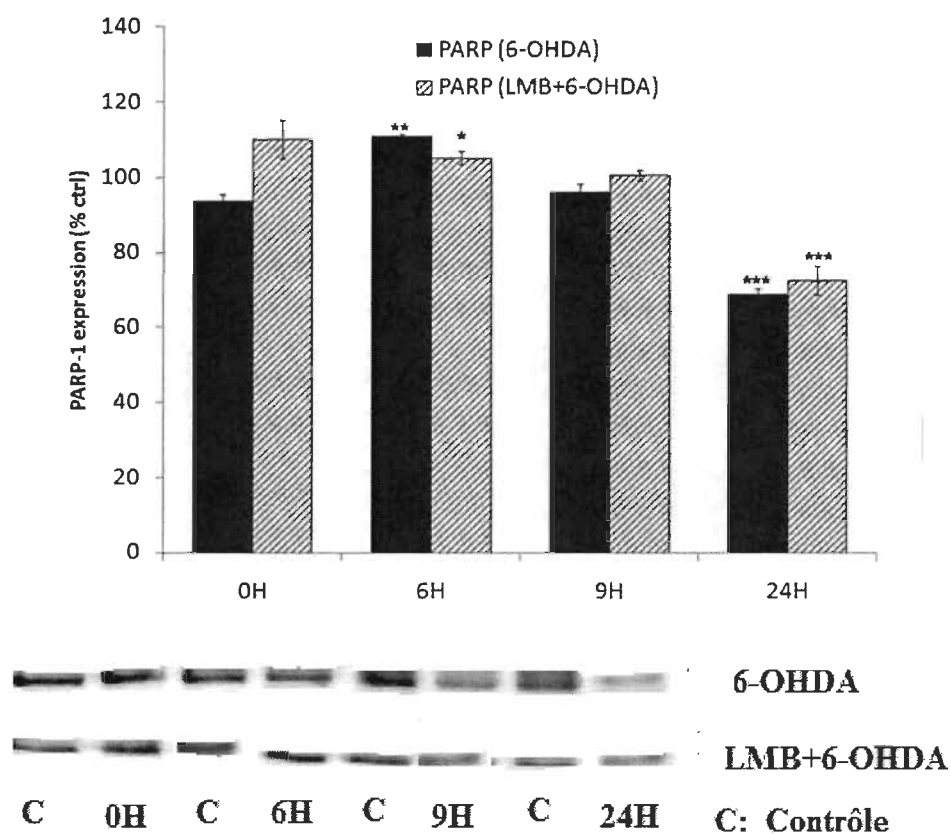


Figure 3.10 : Effet de la modulation de la protéine PARP-1 après traitement à la 6-OHDA avec ou sans pré-traitement à la LMB.
 $n=3$ * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ vs contrôle.

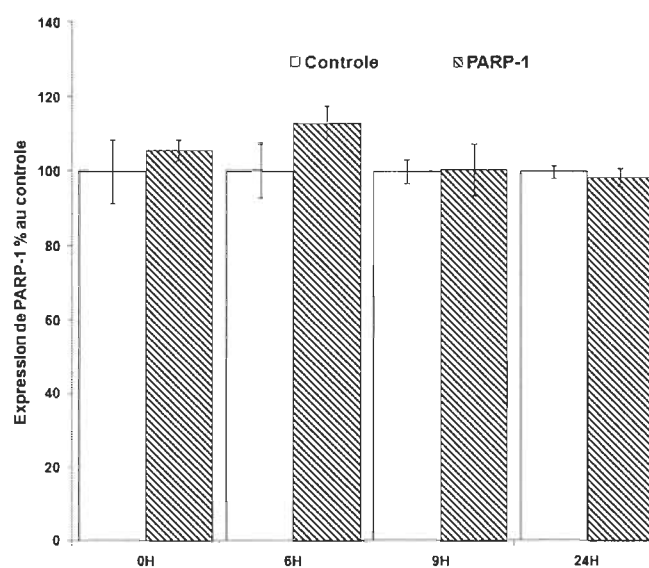


Figure 3.11 : Effet de la LMB sur la modulation de PARP-1.

CHAPITRE IV

CONCLUSIONS

La MP est caractérisée par la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire. La majorité des thérapies utilisées aujourd'hui sont symptomatiques y compris le remplacement du précurseur de la dopamine, la L-dopa, qui cependant, reste encore le traitement le plus répandu. Cette inefficacité du traitement de la MP entraîne une curiosité scientifique d'où la nécessité d'élargir le champ de recherche afin de mieux comprendre les différents mécanismes derrière la mort neuronale. Dans cette option, Wu et ses collaborateurs ont démontré que la translocation de Nur77 induisait l'apoptose plutôt que la transactivation de l'expression des gènes (Wu *et al.* 2002). Le mécanisme de mort cellulaire par apoptose n'est pas encore complètement clair et on pense qu'il ne se limite pas seulement à l'action au niveau mitochondriale (Liang *et al.* 2007).

Ce projet de recherche se concentre d'ailleurs sur la translocation de Nur77 et sur la modulation de certaines protéines apoptotiques. Pour réaliser ces travaux, nous avons utilisé une lignée cellulaire (les PC12), reconnue comme étant un modèle cellulaire pour l'étude *in vitro* de la maladie de Parkinson (Mayo *et al.* 1998; Nie *et al.* 2002; Xiao-Qing *et al.* 2005). En effet, cette lignée cellulaire possède plusieurs caractéristiques typiques des neurones DAergiques telles que la capacité à produire, emmagasiner, sécréter la DA et exprimer les récepteurs de la DA (Kadota *et al.* 1996; Nilsen *et al.* 1998). Ensuite, nous avons aussi utilisé la 6-OHDA qui est reconnue comme une des neurotoxines modèle pour l'étude de la MP. Enfin, comme molécule à l'étude, nous avons utilisé la LMB qui, à son tour, est reconnue comme un puissant anti-fongique capable de bloquer les exportations nucléaires. Avant de faire toutes les expérimentations, nous avons testé l'effet de notre molécule neuroprotectrice sur la modulation de tous nos marqueurs protéiques d'apoptose et nous avons noté que la LMB

administrée seule n'avait aucun effet sur la modulation des différentes protéines à l'étude.

À la différence de la procédure déjà utilisée dans notre laboratoire, (Lahaie-Collins *et al.* 2008; Bournival *et al.* 2009; Carange *et al.* 2011; Ismaili *et al.* 2011) qui fait usage de trois heures de prétraitement, nous avons par contre fait des pré-traitements d'une heure. Ce choix a été fait grâce à la littérature (Wolff *et al.* 1997; Kudo *et al.* 1999; Jang *et al.* 2004) et après avoir fait des essais de pré-traitements d'une heure, de deux heures et de trois heures (résultats non démontrés). L'analyse de ces pré-traitements a démontré qu'en une heure la LMB était capable de bloquer la translocation de Nur77. Donc, pour des raisons de commodité et surtout parce que la durée du traitement n'avait aucune influence sur les résultats obtenus, nous avons choisi de faire des traitements d'une heure.

Les travaux présentés ci-dessus répondent aux objectifs principaux énoncés à la fin de l'introduction de ce mémoire. Comme objectif premier, nous avons vérifié l'effet de la 6-OHDA sur la translocation de Nur77 du noyau au cytoplasme. Les résultats obtenus ont démontré qu'en faisant des traitements avec la 6-OHDA pendant 0, 6, 9 et 24 heures, nos analyses démontrent une augmentation de production de Nur77 dans le noyau à 6 heures, suivi d'une translocation de Nur77 du noyau au cytoplasme à 9 heures. Ce résultat est comparable à celui obtenu dans le passé dans notre laboratoire par d'autres étudiants (résultats non publiés). Cette translocation de Nur77 du noyau au cytoplasme est encore plus évidente quand on calcule le ratio cyto/noyau. Certaines études ont déjà dévoilé que la LMB bloquait la translocation de Nur77 du noyau au cytoplasme et réduisait aussi la quantité de Nur77 dans la fraction nucléaire (Winoto *et al.* 2008), (Crews *et al.* 1999). L'analyse des résultats démontre aussi qu'un pré-traitement d'une heure avec la LMB suivi d'un traitement avec la 6-OHDA, permettent de dire que la LMB retarde la translocation de Nur77 du noyau au cytoplasme. Ensuite la conséquence directe de ce résultat est la réduction du ratio cyto/noyau (de 2.7 à 1.2). Bien que les résultats de cytotoxicité démontrent un nombre élevé de mort cellulaire pour la condition 24 heures, nous n'avons pas cependant observé la translocation de Nur77 du noyau au

cytoplasme pour cette condition. La translocation étant synonyme de perméabilité membranaire, nous pouvons alors conclure que ces résultats permettent également de comprendre que la mort apoptotique est déclenchée après la translocation de Nur77.

Les résultats obtenus ont démontré que la LMB provoquait la réduction de la quantité de protéines Nur77 dans la fraction cytoplasmique. Cette donnée est semblable à celle obtenue par Thompson et Winoto (Thompson *et al.* 2008) cependant, nous avons aussi noté une réduction de la protéine nucléaire 24 heures après le traitement (figure 3.1). Pour mieux interpréter ce résultat, il serait intéressant d'étudier la modulation de l'ARNm de Nur77 afin de conclure si cette réduction est liée à la synthèse de l'ARN ou à la traduction de la protéine.

Ensuite, nous avons vérifié si la LMB avait la capacité de diminuer la mortalité cellulaire induite par la 6-OHDA. Étant donné que c'est une substance assez toxique, nous avons essayé de déterminer la concentration minimale capable de bloquer la translocation de Nur77 avec un pourcentage d'effet toxique minimal. Nos résultats de cytotoxicité par la mesure de la LDH montrent pour les conditions 6, 9 et 24 heures que la 6-OHDA 30 μ M cause respectivement 8 %, 14 % et enfin 45 % de mort cellulaire sur les PC12. Alors qu'un pré-traitement sur ces cellules avec la LMB à une concentration de 10^{-9} M réduit la toxicité induite par la 6-OHDA (voir figure 3.3).

Bien que la LMB ait un effet neuroprotecteur, le haut taux de mortalité du groupe LMB+6-OHDA peut amener beaucoup de discussions. Cependant, il faut se rappeler que l'objectif principal de ce projet était de vérifier que la LMB agisse comme une molécule qui bloque la translocation de Nur77 du noyau au cytoplasme et non comme substance neuroprotectrice. En nous référant à la neuroprotection, nous pensons que ces résultats peuvent être expliqués par le fait que la translocation de Nur77 du noyau au cytoplasme n'est qu'une des causes de la mort cellulaire donc il n'est pas surprenant que notre molécule ait un faible taux de protection. Comme conclusion, nous pensons que la LMB agit seulement sur la mort cellulaire causée par la translocation de Nur77 du noyau au cytoplasme.

Des études récentes démontrent que sous l'effet des stimuli apoptotiques, Nur77 transloque du noyau au cytoplasme, une fois au niveau mitochondrial il interagit avec la molécule anti-apoptotique Bcl-2 et la transforme en une molécule proapoptotique (Lin *et al.* 2004) d'où la mort cellulaire par apoptose. La curiosité scientifique nous amène à poser la question suivante : une fois que nous avons réussi à bloquer la translocation de Nur77 qu'en est-il de la mort apoptotique? Pour essayer de répondre à cette question, nous avons analysé l'expression des gènes membres de la famille de Bcl-2, parce que ces gènes ont pour fonction de promouvoir l'apoptose (Stephan *et al.*) ou d'empêcher l'apoptose Bcl-2. En plus, dans le système nerveux, la sur-expression de Bax induit la mort par apoptose (Vekrellis *et al.* 1997) et bloque aussi l'action de Bcl-2. Enfin, il a été montré que le ratio des protéines pro et anti-apoptotiques, notamment Bax et Bcl-2 déterminent la réponse face à un signal de mort cellulaire (Gross *et al.* 1998). Alors, pour la suite du projet, il était intéressant de voir si la LMB avait un effet sur la modulation des protéines Bax et Bcl-2. Nos résultats démontrent que les traitements des PC12 avec la 6-OHDA permettent la diminution de la protéine Bcl-2, pas d'effets sur la protéine de Bax et comme conséquence nous avons noté une augmentation du ratio de Bax/Bcl-2 de 1.2 (voir figure 3.4). En se référant à la littérature, cette augmentation du ratio est une preuve de mort cellulaire par apoptose (Korsmeyer *et al.* 2000; Wu *et al.* 2007). Cette même figure 3.4 démontre aussi que la LMB réduit la modulation de la protéine Bcl-2 et par conséquent réduit aussi le ratio Bax/Bcl-2 de plus de 95 %.

Certaines études faites sur des cellules cancéreuses démontrent que la conversion de la protéine Bcl-2 vers une forme pro-apoptotique est causée par la translocation de Nur77 du noyau vers la mitochondrie (Lin *et al.* 2004). Étant donné que la LMB retarde la translocation de Nur77 il n'est pas surprenant qu'en bloquant la translocation de Nur77 on observe une stabilité de la modulation de Bcl-2. De plus, le fait que la LMB agit seulement sur les exportations nucléaires nous amène à penser que la diminution de la protéine Bcl-2 est juste liée à la non-formation du complexe Nur77/Bcl-2. Donc, nous pouvons conclure qu'en bloquant la translocation de Nur77, le complexe Nur77/Bcl-2 n'a pas été formé et par conséquent il n'y a pas eu modulation de la protéine Bcl-2.

Bien sûr qu'avant de conclure que la LMB réduit la mort apoptotique, il serait nécessaire d'étudier la modulation d'autres facteurs apoptotiques. En effet, dans des cultures primaires de neurones dopaminergiques soumises à un stress oxydant ou à des inhibiteurs du protéasome, le taux de p53 phosphorylé est augmenté, ce qui est en accord avec des analyses *post-mortem* observés chez des parkinsoniens (Nair 2006; Nair *et al.* 2006). De plus, l'implication de ces voies a également été mise en évidence dans les modèles *in vivo* de la MP (Vila *et al.* 2008). De façon générale, la conséquence de l'activation de p53 est une inhibition de la croissance cellulaire suite à un arrêt du cycle cellulaire, ou à travers l'induction de l'apoptose permettant ainsi d'éviter le développement tumoral de la cellule touchée (Vousden *et al.* 2002). Donc, comme second gène modulé par la mort apoptotique, nous avons étudié la modulation du gène suppresseur p53. Selon les résultats obtenus, nous avons noté que 24 heures après le traitement à la 6-OHDA, il y'avait une augmentation de la protéine p53. Cependant, pour les conditions 0, 6 et 9 heures nous avons noté que le traitement à la 6-OHDA, avec ou sans le pré-traitement à la LMB, n'avait pas d'effets sur la modulation de la protéine p53. Par contre pour la condition 24 heures, le pré-traitement d'une heure avec la LMB, avant l'ajout de la 6-OHDA, nous a permis de noter une réduction de modulation de la protéine p53. Nous pensons que le fait que la LMB réduise la modulation de la protéine p53 et le ratio Bax/Bcl-2 peut être interprété comme un indice indiquant son implication anti-apoptotique. En conclusion, d'après nos résultats obtenus nous pouvons conclure que la LMB réduit la modulation de p53. Ces résultats sont cependant différents de certains présents dans la littérature, qui démontrent que l'ajout de la LMB sur diverses lignées cellulaires cancéreuses a conduit à une augmentation des niveaux de la protéine p53 nucléaire et spécialement la fraction transcriptionnellement active. En fait, Levine et ses collaborateurs rapportent que l'augmentation des niveaux de p53 s'explique par le fait qu'en bloquant les exportations nucléaires on réduit la dégradation de la protéine p53, ce qui entraîne l'augmentation de sa demi-vie (Levine *et al.* 1998). Cependant nos résultats sont semblables aux études de Winoto et son collaborateur qu'ils disent que la LMB a des effets anti-apoptotiques sur des anti CD3+ et CD8+ présents chez les thymocytes (Winoto *et al.* 2008). De plus, la littérature dit aussi qu'en considérant le potentiel thérapeutique de la LMB, il est intéressant de noter que les dommages

d'activité de l'ADN ont été détectés seulement quand on utilisait une concentration de LMB au-dessus de 200 nM, mais aucune induction significative des ruptures des brins d'ADN n'a pu être détectée avec une concentration de 20 nM (Ljungman, *et al* 1999). Suite à l'analyse de ces données de la littérature, nous pensons qu'il n'est pas surprenant de dire que la LMB pourrait avoir un effet anti-apoptotique si nous avons utilisé une concentration de 10^{-9} nM/L.

Malgré que les recherches supportent le fait que la LMB bloque les exportations nucléaires, l'utilisation de cette substance reste seulement limitée à l'étude des maladies virales et cancéreuses. En effet, une des difficultés de ce projet est que nous avons choisi une substance peu connue pour les études des maladies neurodégénératives. Bien qu'elle soit connue comme un antifongique, la LMB n'est pas encore utilisée en clinique chez des humains à cause du fait qu'elle bloque la réplication cellulaire (Ljungman *et al.* 1999). Notre objectif était d'apporter le maximum de résultats possibles pour supporter des études successives sur l'utilisation de la LMB dans le cadre d'études des maladies neurodégénératives.

Nous avons aussi jugé important d'étudier d'autres marqueurs protéiques importants dans le processus de mort apoptotique tels que AIF et PARP-1.

Plus en particulier, AIF est un facteur apoptotique libéré par les mitochondries pendant les événements apoptotiques et ensuite transporté vers le noyau. Cette libération de AIF provoquera une perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et donc favorisera la libération du cytochrome c et de la pro-caspase-9, grâce à un cofacteur cytosolique (Susin *et al.* 1999). Les effets de AIF sont abolis par la surexpression de Bcl-2 et sont les mêmes dans des cellules ayant ou non des activités de caspase, donc AIF agit indépendamment de l'activation des caspases. AIF est inhibé par Hsp70. Étant donné que AIF est très important dans la mort apoptotique, nous avons jugé intéressant étudier sa modulation après administration de la 6-OHDA avec ou sans LMB. Les résultats démontrent que la 6-OHDA induit la translocation de AIF des mitochondries au noyau (apoptose), mais le pré-traitement à la LMB n'a aucun effet sur cette

translocation. Étant donné que la LMB agit sur le récepteur d'exportation CRM1 (maintenance de la région chromosomique) et particulièrement sur les séquences d'exportations nucléaires alors il n'est pas surprenant de noter que la LMB n'a pas d'effets sur la modulation de la protéine AIF. En plus, pour la translocation de AIF, nous avons une importation nucléaire et non une exportation nucléaire, vu que la LMB agit sur les exportations nucléaires, il n'est donc pas surprenant que la LMB n'a pas d'effet sur la translocation de AIF.

En résumé, la LMB bloque partiellement la translocation de Nur77 du noyau au cytoplasme, réduit le ratio Bax/Bcl-2, mais ne réduit pas la translocation de AIF des mitochondries au noyau. En se référant au fait que la littérature reporte que les effets de AIF sont abolis par la surexpression de Bcl-2 et, comme nos résultats ne présentent pas une surexpression de Bcl-2, il n'est pas surprenant d'observer que la LMB n'a pas d'effets sur la translocation de AIF. Bien que la LMB ait un effet sur la protéine anti-apoptotique Bcl-2, cependant elle n'a pas d'effets sur AIF, donc ces résultats nous permettent également de comprendre que son effet anti-apoptotique est très spécifique à certains marqueurs d'apoptose et pas à d'autres.

La libération du cytochrome c reste un événement important dans le processus de mort apoptotique. Notre souhait était d'étudier la modulation de cette protéine, mais nous avons eu beaucoup de difficultés au niveau de l'extraction de la protéine. Après extraction protéique et dosage, la concentration protéique cytosolique obtenue était très petite, nous avons cependant essayé quelques tests d'immunobuvardage de type Western mais après incubation des membranes avec l'anticorps primaire on n'avait pas de bandes à analyser parce qu'il n'y avait pas assez de protéines pour permettre à l'anticorps de se lier. Nous espérons pour le futur trouver une bonne technique d'extraction protéique afin d'étudier la modulation de la protéine du cytochrome c.

Pour terminer et afin de mieux comprendre nos résultats, nous avons aussi étudié l'effet de la LMB sur la modulation de la protéine PARP-1 totale. L'auto modification de PARP-1 favorise le relâchement de l'ADN, permettant ainsi la fixation des enzymes

de réparation sur les sites de l'ADN endommagé. Nos résultats de l'analyse de PARP-1 totale démontrent que 24 heures après le traitement, la 6-OHDA réduit la quantité de la protéine totale de PARP-1. Ces résultats sont semblables à ceux présents dans la littérature, car sous l'effet du stress et lors des dommages à l'ADN on observe une augmentation de PARP-1 totale. Si cette protéine est incapable de réparer les dommages à l'ADN, on aura la formation du PARP-1 clivé caractérisé par la diminution de la PARP-1 totale. Nous pouvons alors conclure que la diminution de la protéine PARP-1 totale est synonyme que la mort apoptotique continue à se dérouler même après notre pré-traitement à la LMB. En nous référant aux résultats de l'effet de la LMB sur la translocation de AIF, les résultats de PARP-1 ne sont pas surprenants parce que la littérature dit que AIF précède PARP-1. Donc nous pouvons conclure que la LMB réduit partiellement l'apoptose parce que bien qu'elle modifie la modulation de certaines protéines apoptotiques, elle reste cependant indifférente sur la modulation des autres protéines apoptotiques.

4.1 Perspectives de recherche

Les résultats de ces recherches sont très encourageants, toutefois il serait intéressant de faire encore des expériences *in vitro* afin de mieux comprendre le mode d'action de la LMB. En effet, l'analyse de ces résultats nous emmène à nous poser de nouvelles questions. Dans un premier temps, nous serons curieux d'étudier d'autres facteurs pro-apoptotiques afin de mieux comprendre les différents mécanismes qui interviennent dans la mort cellulaire par apoptose. Ensuite, nous aimerons aussi étudier l'effet de la LMB sur la translocation de p53 et sur la fragmentation d'ADN. Ces deux résultats pourraient nous aider à mieux comprendre les résultats de AIF et PARP-1. Il serait aussi important de faire des tests entre 10 et 20 heures afin de savoir à peu près à quel moment commence la translocation de AIF.

Afin d'augmenter la neuroprotection, il serait aussi intéressant d'associer la LMB à un autre neuroprotecteur comme l'acide docosahexaénoïque (DHA). Nous avons choisi la DHA parce que beaucoup d'études démontrent son effet neuroprotecteur. Par

exemple, certaines études démontrent qu'un pré-traitement à la DHA protège de l'apoptose induite par la privation de sérum dans les cellules Neuro 2A (Akbar *et al.* 2005; Akbar *et al.* 2006). En plus, ce choix a été fait en nous référant à ces travaux qui disent que l'administration de la DHA pendant 24 heures protège les neurones de la toxicité du peptide amyloïde β (A β) (Florent *et al.* 2006) et atténue l'apoptose induite par les agents apoptotiques comme la sphingosine et l'etoposide (Kishida *et al.* 1998; Wu *et al.* 2007). Enfin, certains travaux suggèrent que la DHA diminue la fragmentation et l'activation de la caspase 3 (Akbar *et al.* 2005; Akbar *et al.* 2006), qui sont des facteurs très importants pour le choix d'un neuroprotecteur. Donc, en nous référant à la littérature, nous pensons qu'en utilisant ces deux composantes (LMB et DHA), la probabilité d'augmenter la neuroprotection sur nos cellules PC12 pourrait être plus élevée.

En effet, il semblerait que le niveau de phosphorylation de Nur77 influence sa localisation cellulaire (Wingate *et al.* 2006). Donc il serait aussi important de voir l'effet de la neurotoxine 6-OHDA sur le niveau de phosphorylation de Nur77 ce qui pourrait expliquer leur effet sur la translocation de Nur77. Enfin, il serait aussi intéressant d'étudier l'effet de la LMB sur la libération du calcium du réticulum endoplasmique puisque Nur77 semble y avoir un effet (Liang *et al.* 2007) et pour terminer, faire le test de fragmentation d'ADN entre dix heures et 20 heures avec ou sans pré-traitement à la LMB pour savoir à quel moment précis il y a plus de mort apoptotique.

Pour terminer, pour contourner le fait que la NGF agit sur la modulation de Nur77, le laboratoire de neurobiologie cellulaire de l'UQTR est en train de mettre au point une technique de différenciation neuronale utilisant l'acide rétinoïque.

BIBLIOGRAPHIE

- Aebischer, P., M. Schluep, N. Deglon, J. M. Joseph, L. Hirt, B. Heyd, M. Goddard, J. P. Hammang, A. D. Zurn, A. C. Kato, F. Regli, E. E. Baetge (1996). "Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients". Nat Med **2**(6): 696-699.
- Akbar, M., F. Calderon, Z. Wen, H. Y. Kim (2005). "Docosahexaenoic acid: a positive modulator of Akt signaling in neuronal survival". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(31): 10858-10863.
- Akbar, M. G., Y. Tamura, M. Ding, H. Ding, M. M. Rosenblatt, K. S. Reddy, S. Surrey, K. Adachi (2006). "Inhibition of hemoglobin S polymerization in vitro by a novel 15-mer EF-helix beta73 histidine-containing peptide". Biochemistry **45**(27): 8358-8367.
- Alvarez-Gonzalez, R., H. Spring, M. Muller, A. Burkle (1999). "Selective loss of poly(ADP-ribose) and the 85-kDa fragment of poly(ADP-ribose) polymerase in nucleoli during alkylation-induced apoptosis of HeLa cells". Journal of Biological Chemistry **274**(45): 32122-32126.
- Amantea, D., R. Russo, G. Bagetta, M. T. Corasaniti (2005). "From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens". Pharmacol Res **52**(2): 119-132.
- Andersen, A. M., J. Olsen, M. N. Gronbaek (2001). "[Did the changed guidelines on alcohol and pregnancy by the National Board of Health and Welfare change alcohol consumption of pregnant women?]". Ugeskr Laeger **163**(11): 1561-1565.
- Andersen, J. K. (2001). "Does neuronal loss in Parkinson's disease involve programmed cell death?". Bioessays **23**(7): 640-646.
- Andersen, J. N., T. Balasubramanian, C. O. Almblad, L. I. Johansson, R. Nyholm (2001). "Strong phonon replicas in Be 1s photoemission spectra". Phys Rev Lett **86**(19): 4398-4401.
- Ashe, P. C., M. D. Berry (2003). "Apoptotic signaling cascades". Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **27**(2): 199-214.

- Bandoh, S., T. Tsukada, K. Maruyama, N. Ohkura, K. Yamaguchi (1997). "Differential expression of NGFI-B and RNR-1 genes in various tissues and developing brain of the rat: comparative study by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction". J Neuroendocrinol **9**(1): 3-8.
- Bandopadhyay, R., A. E. Kingsbury, M. R. Cookson, A. R. Reid, I. M. Evans, A. D. Hope, A. M. Pittman, T. Lashley, R. Canet-Aviles, D. W. Miller, C. McLendon, C. Strand, A. J. Leonard, P. M. Abou-Sleiman, D. G. Healy, H. Ariga, N. W. Wood, R. de Silva, T. Revesz, J. A. Hardy, A. J. Lees (2004). "The expression of DJ-1 (PARK7) in normal human CNS and idiopathic Parkinson's disease". Brain **127**(Pt 2): 420-430.
- Barbeau, A., M. Roy, G. Bernier, G. Campanella, S. Paris (1987). "Ecogenetics of Parkinson's disease: prevalence and environmental aspects in rural areas". Can J Neurol Sci **14**(1): 36-41.
- Beaudry, G., M. C. Langlois, I. Weppe, C. Rouillard, D. Levesque (2000). "Contrasting patterns and cellular specificity of transcriptional regulation of the nuclear receptor nerve growth factor-inducible B by haloperidol and clozapine in the rat forebrain". Journal of Neurochemistry **75**(4): 1694-1702.
- Benrimoj, S. I., J. H. Langford, G. Berry, D. Collins, R. Lauchlan, K. Stewart, M. Aristides, M. Dobson (2000). "Economic impact of increased clinical intervention rates in community pharmacy. A randomised trial of the effect of education and a professional allowance". Pharmacoeconomics **18**(5): 459-468.
- Berry, M. D., A. A. Boulton (2000). "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and apoptosis". J Neurosci Res **60**(2): 150-154.
- Bindoff, L. A., M. Birch-Machin, N. E. Cartlidge, W. D. Parker, Jr., D. M. Turnbull (1989). "Mitochondrial function in Parkinson's disease". Lancet **2**(8653): 49.
- Bohrer, S., L. Ades, N. Tajeddine, W. K. Hofmann, S. Kriener, G. Bug, O. G. Ottmann, M. Ruthardt, L. Galluzzi, C. Fouassier, M. Tailler, K. A. Olaussen, C. Gardin, V. Eclache, S. de Botton, S. Thepot, P. Fenaux, G. Kroemer (2009). "Suppression of the DNA damage response in acute myeloid leukemia versus myelodysplastic syndrome". Oncogene **28**(22): 2205-2218.
- Bonifati, V., P. Rizzu, M. J. van Baren, O. Schaap, G. J. Breedveld, E. Krieger, M. C. Dekker, F. Squitieri, P. Ibanez, M. Joosse, J. W. van Dongen, N. Vanacore, J. C. van Swieten, A. Brice, G. Meco, C. M. van Duijn, B. A. Oostra, P. Heutink (2003). "Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism". Science **299**(5604): 256-259.

- Bournival, J., P. Quessy, M. G. Martinoli (2009). "Protective effects of resveratrol and quercetin against MPP⁺ -induced oxidative stress act by modulating markers of apoptotic death in dopaminergic neurons". Cell Mol Neurobiol **29**(8): 1169-1180.
- Brouillet, E., M. Peschanski, P. Hantraye (2000). "Toward understanding the molecular pathology of Huntington's disease". M S-Medecine Sciences **16**(1): 57-63.
- Bruchelt, G., I. U. Schraufstatter, D. Niethammer, C. G. Cochrane (1991). "Ascorbic acid enhances the effects of 6-hydroxydopamine and H₂O₂ on iron-dependent DNA strand breaks and related processes in the neuroblastoma cell line SK-N-SH". Cancer Res **51**(22): 6066-6072.
- Canman, C. E., M. B. Kastan (1995). "Induction of apoptosis by tumor suppressor genes and oncogenes". Semin Cancer Biol **6**(1): 17-25.
- Carange, J., F. Longpre, B. Daoust, M. G. Martinoli (2011). "24-Epibrassinolide, a Phytosterol from the Brassinosteroid Family, Protects Dopaminergic Cells against MPP-Induced Oxidative Stress and Apoptosis". J Toxicol **2011**: 392859.
- Chang, C., J. Kokontis, L. Acakpo-Satchivi, S. Liao, H. Takeda, Y. Chang (1989). "Molecular cloning of new human TR2 receptors: a class of steroid receptor with multiple ligand-binding domains". Biochem Biophys Res Commun **165**(2): 735-741.
- Chen, K. S., F. H. Gage (1995). "Somatic gene transfer of NGF to the aged brain: behavioral and morphological amelioration". J Neurosci **15**(4): 2819-2825.
- Conway, E. M., S. Pollefeyt, J. Cornelissen, I. DeBaere, M. Steiner-Mosonyi, K. Ong, M. Baens, D. Collen, A. C. Schuh (2000). "Three differentially expressed survivin cDNA variants encode proteins with distinct antiapoptotic functions". Blood **95**(4): 1435-1442.
- Cookson, M. R., J. Hardy, P. A. Lewis (2008). "Genetic neuropathology of Parkinson's disease". Int J Clin Exp Pathol **1**(3): 217-231.
- Cortez, N., F. Trejo, P. Vergara, J. Segovia (2000). "Primary astrocytes retrovirally transduced with a tyrosine hydroxylase transgene driven by a glial-specific promoter elicit behavioral recovery in experimental parkinsonism". J Neurosci Res **59**(1): 39-46.

- Cory, S., D. C. Huang, J. M. Adams (2003). "The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis". Oncogene **22**(53): 8590-8607.
- Crews, C. M., U. Splittgerber (1999). "Chemical genetics: exploring and controlling cellular processes with chemical probes". Trends in biochemical sciences **24**(8): 317-320.
- Cummings, J. L. (1988). "Intellectual impairment in Parkinson's disease: clinical, pathologic, and biochemical correlates". J Geriatr Psychiatry Neurol **1**(1): 24-36.
- Curtin, N. J. (2005). "PARP inhibitors for cancer therapy". Expert Rev Mol Med **7**(4): 1-20.
- Damier, P., E. C. Hirsch, Y. Agid, A. M. Graybiel (1999). "The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease". Brain **122** (Pt 8): 1437-1448.
- Dastoor, Z., J. L. Dreyer (2001). "Potential role of nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in apoptosis and oxidative stress". J Cell Sci **114**(Pt 9): 1643-1653.
- Dauer, W., S. Przedborski (2003). "Parkinson's disease: mechanisms and models". Neuron **39**(6): 889-909.
- Davis, I. J., T. G. Hazel, R. H. Chen, J. Blenis, L. F. Lau (1993). "Functional domains and phosphorylation of the orphan receptor Nur77". Mol Endocrinol **7**(8): 953-964.
- Dluzen, D., M. Horstink (2003). "Estrogen as neuroprotectant of nigrostriatal dopaminergic system: laboratory and clinical studies". Endocrine **21**(1): 67-75.
- Eliasson, M. J., K. Sampei, A. S. Mandir, P. D. Hurn, R. J. Traystman, J. Bao, A. Pieper, Z. Q. Wang, T. M. Dawson, S. H. Snyder, V. L. Dawson (1997). "Poly (ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia". Nat Med **3**(10): 1089-1095.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death". Toxicol Pathol **35**(4): 495-516.

- Endres, M., Z. Q. Wang, S. Namura, C. Waeber, M. A. Moskowitz (1997). "Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADP-ribose)polymerase". J Cereb Blood Flow Metab **17**(11): 1143-1151.
- Farrer, M., P. Chan, R. Chen, L. Tan, S. Lincoln, D. Hernandez, L. Forno, K. Gwinn-Hardy, L. Petrucelli, J. Hussey, A. Singleton, C. Tanner, J. Hardy, J. W. Langston (2001). "Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations". Ann Neurol **50**(3): 293-300.
- Ferrer, I., R. Blanco, B. Cutillas, S. Ambrosio (2000). "Fas and Fas-L expression in Huntington's disease and Parkinson's disease". Neuropathol Appl Neurobiol **26**(5): 424-433.
- Ferri, K. F., G. Kroemer (2001). "Mitochondria--the suicide organelles". Bioessays **23**(2): 111-115.
- Finiels, F., M. Gimenez y Ribotta, M. Barkats, M. L. Samolyk, J. J. Robert, A. Privat, F. Revah, J. Mallet (1995). "Specific and efficient gene transfer strategy offers new potentialities for the treatment of motor neurone diseases". Neuroreport **7**(1): 373-378.
- Florent, S., C. Malaplate-Armand, I. Youssef, B. Kriem, V. Koziel, M. C. Escanye, A. Fife, I. Sponne, B. Leininger-Muller, J. L. Olivier, T. Pillot, T. Oster (2006). "Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid-beta oligomers". Journal of neurochemistry **96**(2): 385-395.
- Forman, B. M., K. Umesono, J. Chen, R. M. Evans (1995). "Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors". Cell **81**(4): 541-550.
- Fridman, J. S., S. W. Lowe (2003). "Control of apoptosis by p53". Oncogene **22**(56): 9030-9040.
- Funayama, M., K. Hasegawa, H. Kowa, M. Saito, S. Tsuji, F. Obata (2002). "A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1". Ann Neurol **51**(3): 296-301.
- Gandhi, S., M. M. Muqit, L. Stanyer, D. G. Healy, P. M. Abou-Sleiman, I. Hargreaves, S. Heales, M. Ganguly, L. Parsons, A. J. Lees, D. S. Latchman, J. L. Holton, N. W. Wood, T. Revesz (2006). "PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease". Brain **129**(Pt 7): 1720-1731.

- Gerlach, M., P. Riederer (1996). "Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man". J Neural Transm **103**(8-9): 987-1041.
- Ghadge, G. D., R. P. Roos, U. J. Kang, R. Wollmann, P. S. Fishman, A. M. Kalynych, E. Barr, J. M. Leiden (1995). "CNS gene delivery by retrograde transport of recombinant replication-defective adenoviruses". Gene Ther **2**(2): 132-137.
- Glinka, Y. Y., M. B. Youdim (1995). "Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine". Eur J Pharmacol **292**(3-4): 329-332.
- Golbe, L. I., G. Di Iorio, V. Bonavita, D. C. Miller, R. C. Duvoisin (1990). "A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease". Ann Neurol **27**(3): 276-282.
- Gowers, W. R. (1893). "An Address on Neurology and Therapeutics: Delivered before the Medical Society of London". Br Med J **1**(1685): 781-782.
- Green, D. R., G. Kroemer (2004). "The pathophysiology of mitochondrial cell death". Science **305**(5684): 626-629.
- Hamamoto, T., S. Gunji, H. Tsuji, T. Beppu (1983). "Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. I. Taxonomy of the producing strain and their fermentation, purification and characterization". J Antibiot (Tokyo) **36**(6): 639-645.
- Han, Y. H., X. Cao, B. Lin, F. Lin, S. K. Kolluri, J. Stebbins, J. C. Reed, M. I. Dawson, X. K. Zhang (2006). "Regulation of Nur77 nuclear export by c-Jun N-terminal kinase and Akt". Oncogene **25**(21): 2974-2986.
- Hanagasi, H. A., S. Akat, H. Gurvit, J. Yazici, M. Emre (2011). "Pain is common in Parkinson's disease". Clin Neurol Neurosurg **113**(1): 11-13.
- Hartmann, A., S. Hunot, P. P. Michel, M. P. Muriel, S. Vyas, B. A. Faucheux, A. Mouatt-Prigent, H. Turmel, A. Srinivasan, M. Ruberg, G. I. Evan, Y. Agid, E. C. Hirsch (2000). "Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease". Proc Natl Acad Sci U S A **97**(6): 2875-2880.

- Hartmann, A., A. Mouatt-Prigent, M. Vila, N. Abbas, C. Perier, B. A. Faucheux, S. Vyas, E. C. Hirsch (2002). "Increased expression and redistribution of the antiapoptotic molecule Bcl-xL in Parkinson's disease". Neurobiol Dis **10**(1): 28-32.
- Hartmann, A., J. D. Troadec, S. Hunot, K. Kikly, B. A. Faucheux, A. Mouatt-Prigent, M. Ruberg, Y. Agid, E. C. Hirsch (2001). "Caspase-8 is an effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease, but pathway inhibition results in neuronal necrosis". Journal of Neuroscience **21**(7): 2247-2255.
- Harvey, R. J., M. Topf, K. Harvey, M. I. Rees (2008). "The genetics of hyperekplexia: more than startle!". Trends Genet **24**(9): 439-447.
- Haupt, S., M. Berger, Z. Goldberg, Y. Haupt (2003). "Apoptosis - the p53 network". J Cell Sci **116**(Pt 20): 4077-4085.
- Hazel, T. G., D. Nathans, L. F. Lau (1988). "A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily". Proc Natl Acad Sci U S A **85**(22): 8444-8448.
- Hefti, F. (1994). "Neurotrophic factor therapy for nervous system degenerative diseases". J Neurobiol **25**(11): 1418-1435.
- Hirayama, Y., K. Kohda, M. Andoh, S. Matsumoto, O. Nakazawa, A. Nobuoka, C. Mochizuki, N. Takayanagi, A. Ezoe (1996). "Syndrome of the sea-blue histiocyte". Intern Med **35**(5): 419-421.
- Hirsch, E. C., S. Hunot, B. Faucheux, Y. Agid, Y. Mizuno, H. Mochizuki, W. G. Tatton, N. Tatton, W. C. Olanow (1999). "Dopaminergic neurons degenerate by apoptosis in Parkinson's disease". Mov Disord **14**(2): 383-385.
- Hirsch, E. C., S. Hunot, A. Hartmann (2000). "Mechanism of cell death in experimental models of Parkinson's disease". Funct Neurol **15**(4): 229-237.
- Hobson, D. E., A. E. Lang, W. R. Martin, A. Razmy, J. Rivest, J. Fleming (2002). "Excessive daytime sleepiness and sudden-onset sleep in Parkinson disease: a survey by the Canadian Movement Disorders Group". JAMA **287**(4): 455-463.
- Holdorff, B. (2002). "Friedrich Heinrich Lewy (1885-1950) and his work". J Hist Neurosci **11**(1): 19-28.

- Hong, S. J., T. M. Dawson, V. L. Dawson (2004). "Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling". Trends Pharmacol Sci **25**(5): 259-264.
- Hsu, H. C., T. Zhou, J. D. Mountz (2004). "Nur77 family of nuclear hormone receptors". Curr Drug Targets Inflamm Allergy **3**(4): 413-423.
- Hughes, A. J., S. E. Daniel, A. J. Lees (2001). "Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson's disease". Neurology **57**(8): 1497-1499.
- Ismaili, J., M. Boisvert, F. Longpre, J. Carange, C. L. Gall, M. G. Martinoli, B. Daoust (2011). "Brassinosteroids and analogs as neuroprotectors: Synthesis and structure-activity relationships". Steroids.
- Jang, B. C., J. H. Paik, H. Y. Jeong, H. J. Oh, J. W. Park, T. K. Kwon, D. K. Song, J. G. Park, S. P. Kim, J. H. Bae, K. C. Mun, M. H. Suh, M. Yoshida, S. I. Suh (2004). "Leptomycin B-induced apoptosis is mediated through caspase activation and down-regulation of Mcl-1 and XIAP expression, but not through the generation of ROS in U937 leukemia cells". Biochemical Pharmacology **68**(2): 263-274.
- Jenner, P. (2003). "Oxidative stress in Parkinson's disease". Ann Neurol **53 Suppl 3**: S26-36; discussion S36-28.
- Jeong, J. H., J. S. Park, B. Moon, M. C. Kim, J. K. Kim, S. Lee, H. Suh, N. D. Kim, J. M. Kim, Y. C. Park, Y. H. Yoo (2003). "Orphan nuclear receptor Nur77 translocates to mitochondria in the early phase of apoptosis induced by synthetic chenodeoxycholic acid derivatives in human stomach cancer cell line SNU-1". Ann N Y Acad Sci **1010**: 171-177.
- Joza, N., G. Kroemer, J. M. Penninger (2002). "Genetic analysis of the mammalian cell death machinery". Trends Genet **18**(3): 142-149.
- Jurgensmeier, J. M., Z. Xie, Q. Deveraux, L. Ellerby, D. Bredesen, J. C. Reed (1998). "Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria". Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 4997-5002.
- Kadota, T., T. Yamaai, Y. Saito, Y. Akita, S. Kawashima, K. Moroi, N. Inagaki, K. Kadota (1996). "Expression of dopamine transporter at the tips of growing neurites of PC12 cells". J Histochem Cytochem **44**(9): 989-996.

- Kastner, P., M. Mark, P. Chambon (1995). "Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life?". Cell **83**(6): 859-869.
- Kaufmann, S. H., M. O. Hengartner (2001). "Programmed cell death: alive and well in the new millennium". Trends Cell Biol **11**(12): 526-534.
- Keeney, P. M., J. Xie, R. A. Capaldi, J. P. Bennett, Jr. (2006). "Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled". J Neurosci **26**(19): 5256-5264.
- Kerr, J. F., J. Searle (1972). "A mode of cell loss in malignant neoplasms". J Pathol **106**(1): Pxi.
- Khan, N. L., D. J. Brooks, N. Pavese, M. G. Sweeney, N. W. Wood, A. J. Lees, P. Piccini (2002). "Progression of nigrostriatal dysfunction in a parkin kindred: an [18F]dopa PET and clinical study". Brain **125**(Pt 10): 2248-2256.
- Khan, N. L., E. M. Valente, A. R. Bentivoglio, N. W. Wood, A. Albanese, D. J. Brooks, P. Piccini (2002). "Clinical and subclinical dopaminergic dysfunction in PARK6-linked parkinsonism: an 18F-dopa PET study". Ann Neurol **52**(6): 849-853.
- Kishida, E., M. Yano, M. Kasahara, Y. Masuzawa (1998). "Distinctive inhibitory activity of docosahexaenoic acid against sphingosine-induced apoptosis". Biochimica et biophysica acta **1391**(3): 401-408.
- Kitada, T., S. Asakawa, N. Hattori, H. Matsumine, Y. Yamamura, S. Minoshima, M. Yokochi, Y. Mizuno, N. Shimizu (1998). "Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism". Nature **392**(6676): 605-608.
- Komiyama, K., K. Okada, S. Tomisaka, I. Umezawa, T. Hamamoto, T. Beppu (1985). "Antitumor activity of leptomycin B". J Antibiot (Tokyo) **38**(3): 427-429.
- Kondo, K., S. Obitsu, S. Ohta, K. Matsunami, H. Otsuka, R. Teshima (2010). "Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-1-independent apoptosis-inducing factor (AIF) release and cell death are induced by eleostearic acid and blocked by alpha-tocopherol and MEK inhibition". J Biol Chem **285**(17): 13079-13091.
- Korsmeyer, S. J., M. C. Wei, M. Saito, S. Weiler, K. J. Oh, P. H. Schlesinger (2000). "Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c". Cell death and differentiation **7**(12): 1166-1173.

- Kosaka, K., M. Yoshimura, K. Ikeda, H. Budka (1984). "Diffuse type of Lewy body disease: progressive dementia with abundant cortical Lewy bodies and senile changes of varying degree--a new disease?". Clin Neuropathol **3**(5): 185-192.
- Koumenis, C., R. Alarcon, E. Hammond, P. Sutphin, W. Hoffman, M. Murphy, J. Derr, Y. Taya, S. W. Lowe, M. Kastan, A. Giaccia (2001). "Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation". Mol Cell Biol **21**(4): 1297-1310.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M. E. Peter, J. Tschoop, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, G. Melino (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009". Cell Death Differ **16**(1): 3-11.
- Kroemer, G., J. C. Reed (2000). "Mitochondrial control of cell death". Nat Med **6**(5): 513-519.
- Kudo, N., N. Matsumori, H. Taoka, D. Fujiwara, E. P. Schreiner, B. Wolff, M. Yoshida, S. Horinouchi (1999). "Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(16): 9112-9117.
- Kumar, R., A. K. Agarwal, P. K. Seth (1995). "Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine". Journal of Neurochemistry **64**(4): 1703-1707.
- Kuwana, T., L. Bouchier-Hayes, J. E. Chipuk, C. Bonzon, B. A. Sullivan, D. R. Green, D. D. Newmeyer (2005). "BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly". Mol Cell **17**(4): 525-535.
- Lahaie-Collins, V., J. Bournival, M. Plouffe, J. Carange, M. G. Martinoli (2008). "Sesamin modulates tyrosine hydroxylase, superoxide dismutase, catalase, inducible NO synthase and interleukin-6 expression in dopaminergic cells under MPP(+)-induced oxidative stress". Oxidative Medicine and Cellular Longevity **1**(1): 54-62.
- Lambeng, N., R. Hourez, S. Torch, J. M. Verna, D. Blum (2002). "Biochemical and molecular mechanisms of neuronal cell death in the experimental neurotoxic models of Parkinson's disease". M S-Medecine Sciences **18**(4): 457-466.

- Leber, B., J. Lin, D. W. Andrews (2007). "Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes". Apoptosis **12**(5): 897-911.
- Lees, A. J., J. Hardy, T. Revesz (2009). "Parkinson's disease". Lancet **373**(9680): 2055-2066.
- Leroy, E., R. Boyer, G. Auburger, B. Leube, G. Ulm, E. Mezey, G. Harta, M. J. Brownstein, S. Jonnalagada, T. Chernova, A. Dehejia, C. Lavedan, T. Gasser, P. J. Steinbach, K. D. Wilkinson, M. H. Polymeropoulos (1998). "The ubiquitin pathway in Parkinson's disease". Nature **395**(6701): 451-452.
- Letai, A., M. C. Bassik, L. D. Walensky, M. D. Sorcinelli, S. Weiler, S. J. Korsmeyer (2002). "Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics". Cancer Cell **2**(3): 183-192.
- Levallois, C., A. Privat, J. Mallet (1994). "Adenovirus insertion encoding the Lac Z gene in human nervous cells in primary dissociated cultures". C R Acad Sci III **317**(6): 495-498.
- Levesque, D., C. Rouillard (2007). "Nur77 and retinoid X receptors: crucial factors in dopamine-related neuroadaptation". Trends Neurosci **30**(1): 22-30.
- Levine, A. J., D. A. Freedman (1998). "Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6". Molecular and Cellular Biology **18**(12): 7288-7293.
- Li, H., S. K. Kolluri, J. Gu, M. I. Dawson, X. Cao, P. D. Hobbs, B. Lin, G. Chen, J. Lu, F. Lin, Z. Xie, J. A. Fontana, J. C. Reed, X. Zhang (2000). "Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3". Science **289**(5482): 1159-1164.
- Liang, B., X. Song, G. Liu, R. Li, J. Xie, L. Xiao, M. Du, Q. Zhang, X. Xu, X. Gan, D. Huang (2007). "Involvement of TR3/Nur77 translocation to the endoplasmic reticulum in ER stress-induced apoptosis". Exp Cell Res **313**(13): 2833-2844.
- Lim, R. W., B. C. Varnum, H. R. Herschman (1987). "Cloning of tetradecanoyl phorbol ester-induced 'primary response' sequences and their expression in density-arrested Swiss 3T3 cells and a TPA non-proliferative variant". Oncogene **1**(3): 263-270.

- Lin, B., S. K. Kolluri, F. Lin, W. Liu, Y. H. Han, X. Cao, M. I. Dawson, J. C. Reed, X. K. Zhang (2004). "Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3". Cell **116**(4): 527-540.
- Lindahl, T., M. S. Satoh, G. G. Poirier, A. Klungland (1995). "Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks". Trends Biochem Sci **20**(10): 405-411.
- Liou, H. H., M. C. Tsai, C. J. Chen, J. S. Jeng, Y. C. Chang, S. Y. Chen, R. C. Chen (1997). "Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan". Neurology **48**(6): 1583-1588.
- Liu, Y., M. Kulesz-Martin (2000). "P53 regulation and function in normal cells and tumors". Medicina (B Aires) **60 Suppl 2**: 9-11.
- Liu, Z. G., S. W. Smith, K. A. McLaughlin, L. M. Schwartz, B. A. Osborne (1994). "Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77". Nature **367**(6460): 281-284.
- Ljungman, M., F. Zhang, F. Chen, A. J. Rainbow, B. C. McKay (1999). "Inhibition of RNA polymerase II as a trigger for the p53 response". Oncogene **18**(3): 583-592.
- Lockshin, R. A., Z. Zakeri (2001). "Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory". Nat Rev Mol Cell Biol **2**(7): 545-550.
- Lorenzo, H. K., S. A. Susin, J. Penninger, G. Kroemer (1999). "Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death". Cell Death Differ **6**(6): 516-524.
- Lowe, J., H. McDermott, M. Landon, R. J. Mayer, K. D. Wilkinson (1990). "Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PGP 9.5) is selectively present in ubiquitinated inclusion bodies characteristic of human neurodegenerative diseases". J Pathol **161**(2): 153-160.
- Lucking, C. B., A. Durr, V. Bonifati, J. Vaughan, G. De Michele, T. Gasser, B. S. Harhangi, G. Meco, P. Denefle, N. W. Wood, Y. Agid, A. Brice (2000). "Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene". N Engl J Med **342**(21): 1560-1567.

- Maheux, J., I. Ethier, C. Rouillard, D. Levesque (2005). "Induction patterns of transcription factors of the nur family (nurr1, nur77, and nor-1) by typical and atypical antipsychotics in the mouse brain: implication for their mechanism of action". J Pharmacol Exp Ther **313**(1): 460-473.
- Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, R. M. Evans (1995). "The nuclear receptor superfamily: the second decade". Cell **83**(6): 835-839.
- Martinez-Gonzalez, J., L. Badimon (2005). "The NR4A subfamily of nuclear receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular cells". Cardiovasc Res **65**(3): 609-618.
- Mayo, J. C., R. M. Sainz, H. Uria, I. Antolin, M. M. Esteban, C. Rodriguez (1998). "Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson's disease". Journal of pineal research **24**(3): 179-192.
- Menza, M., R. D. Dobkin, H. Marin, K. Bienfait (2010). "Sleep disturbances in Parkinson's disease". Mov Disord **25 Suppl 1**: S117-122.
- Miklossy, J., T. Arai, J. P. Guo, A. Klegeris, S. Yu, E. G. McGeer, P. L. McGeer (2006). "LRRK2 expression in normal and pathologic human brain and in human cell lines". J Neuropathol Exp Neurol **65**(10): 953-963.
- Milbrandt, J. (1988). "Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene". Neuron **1**(3): 183-188.
- Mitra, T., K. R. Chaudhuri (2009). "Sleep dysfunction and role of dysautonomia in Parkinson's disease". Parkinsonism Relat Disord **15 Suppl 3**: S93-95.
- Mizuno, Y., S. Ohta, M. Tanaka, S. Takamiya, K. Suzuki, T. Sato, H. Oya, T. Ozawa, Y. Kagawa (1989). "Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease". Biochem Biophys Res Commun **163**(3): 1450-1455.
- Mochizuki, H., K. Goto, H. Mori, Y. Mizuno (1996). "Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease". J Neurol Sci **137**(2): 120-123.
- Mogi, M., M. Harada, T. Kondo, Y. Mizuno, H. Narabayashi, P. Riederer, T. Nagatsu (1996). "The soluble form of Fas molecule is elevated in parkinsonian brain tissues". Neurosci Lett **220**(3): 195-198.

- Mogi, M., T. Kondo, Y. Mizuno, T. Nagatsu (2007). "p53 protein, interferon-gamma, and NF-kappaB levels are elevated in the parkinsonian brain". Neurosci Lett **414**(1): 94-97.
- Mogi, M., A. Togari, T. Kondo, Y. Mizuno, O. Komure, S. Kuno, H. Ichinose, T. Nagatsu (2000). "Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain". J Neural Transm **107**(3): 335-341.
- Moll, U. M., N. Marchenko, X. K. Zhang (2006). "p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction". Oncogene **25**(34): 4725-4743.
- Mori, H., T. Kondo, M. Yokochi, H. Matsumine, Y. Nakagawa-Hattori, T. Miyake, K. Suda, Y. Mizuno (1998). "Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q". Neurology **51**(3): 890-892.
- Nair, V. D. (2006). "Activation of p53 signaling initiates apoptotic death in a cellular model of Parkinson's disease". Apoptosis **11**(6): 955-966.
- Nair, V. D., K. S. McNaught, J. Gonzalez-Maeso, S. C. Sealfon, C. W. Olanow (2006). "p53 mediates nontranscriptional cell death in dopaminergic cells in response to proteasome inhibition". J Biol Chem **281**(51): 39550-39560.
- Nicholson, D. W., A. Ali, N. A. Thornberry, J. P. Vaillancourt, C. K. Ding, M. Gallant, Y. Gareau, P. R. Griffin, M. Labelle, Y. A. Lazebnik, et al. (1995). "Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis". Nature **376**(6535): 37-43.
- Nie, G., C. Jin, Y. Cao, S. Shen, B. Zhao (2002). "Distinct effects of tea catechins on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells". Archives of biochemistry and biophysics **397**(1): 84-90.
- Nilsen, J., G. Mor, F. Naftolin (1998). "Raloxifene induces neurite outgrowth in estrogen receptor positive PC12 cells". Menopause **5**(4): 211-216.
- Nishi, K., M. Yoshida, D. Fujiwara, M. Nishikawa, S. Horinouchi, T. Beppu (1994). "Leptomycin B targets a regulatory cascade of crm1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression". J Biol Chem **269**(9): 6320-6324.

- Norbury, C. J., B. Zhivotovsky (2004). "DNA damage-induced apoptosis". Oncogene **23**(16): 2797-2808.
- Obeso, J. A., C. W. Olanow, J. G. Nutt (2000). "Levodopa motor complications in Parkinson's disease". Trends Neurosci **23**(10 Suppl): S2-7.
- Okazaki, H., L. E. Lipkin, S. M. Aronson (1961). "Diffuse intracytoplasmic ganglionic inclusions (Lewy type) associated with progressive dementia and quadriplegia in flexion". J Neuropathol Exp Neurol **20**: 237-244.
- Oppenheim, S. (1911). Probleme der modernen astronomie. Leipzig, B. G. Teubner.
- Parker, W. D., Jr., S. J. Boyson, J. K. Parks (1989). "Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease". Ann Neurol **26**(6): 719-723.
- Patrick, H., D. Levy (1922). "Parkinson's disease. A clinical study of one hundred and forty-six cases". Archives of Neurology Psychiatry(7): 711-720.
- Perier, C., K. Tieu, C. Guegan, C. Caspersen, V. Jackson-Lewis, V. Carelli, A. Martinuzzi, M. Hirano, S. Przedborski, M. Vila (2005). "Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage". Proc Natl Acad Sci U S A **102**(52): 19126-19131.
- Perlmann, T., L. Jansson (1995). "A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1". Genes Dev **9**(7): 769-782.
- Petit, H., H. Allain, P. Vermersch (1994). La maladie de Parkinson; clinique et thérapeutique, Paris, France.
- Pirozzolo, F. J., E. C. Hansch, J. A. Mortimer, D. D. Webster, M. A. Kuskowski (1982). "Dementia in Parkinson disease: a neuropsychological analysis". Brain Cogn **1**(1): 71-83.
- Politis, M., K. Wu, S. Molloy, G. B. P, K. R. Chaudhuri, P. Piccini (2010). "Parkinson's disease symptoms: the patient's perspective". Mov Disord **25**(11): 1646-1651.
- Pollak, P. (2004). "Movement disorders: Parkinson's disease dominates". Lancet Neurol **3**(1): 15.

- Polymeropoulos, M. H., C. Lavedan, E. Leroy, S. E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E. S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W. G. Johnson, A. M. Lazzarini, R. C. Duvoisin, G. Di Iorio, L. I. Golbe, R. L. Nussbaum (1997). "Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease". Science **276**(5321): 2045-2047.
- Ravagnan, L., S. Gurbuxani, S. A. Susin, C. Maise, E. Daugas, N. Zamzami, T. Mak, M. Jaattela, J. M. Penninger, C. Garrido, G. Kroemer (2001). "Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor". Nat Cell Biol **3**(9): 839-843.
- Reed, J. C. (1998). "Bcl-2 family proteins". Oncogene **17**(25): 3225-3236.
- Reed, J. C. (2000). "Mechanisms of apoptosis". Am J Pathol **157**(5): 1415-1430.
- Remy, P., M. Doder, A. Lees, N. Turjanski, D. Brooks (2005). "Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system". Brain **128**(Pt 6): 1314-1322.
- Ritz, B., F. Yu (2000). "Parkinson's disease mortality and pesticide exposure in California 1984-1994". Int J Epidemiol **29**(2): 323-329.
- Rosse, T., R. Olivier, L. Monney, M. Rager, S. Conus, I. Fellay, B. Jansen, C. Borner (1998). "Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c". Nature **391**(6666): 496-499.
- Ryseck, R. P., H. Macdonald-Bravo, M. G. Mattei, S. Ruppert, R. Bravo (1989). "Structure, mapping and expression of a growth factor inducible gene encoding a putative nuclear hormonal binding receptor". EMBO J **8**(11): 3327-3335.
- Satoh, M. S., T. Lindahl (1992). "Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair". Nature **356**(6367): 356-358.
- Schapira, A. H., J. M. Cooper, D. Dexter, P. Jenner, J. B. Clark, C. D. Marsden (1989). "Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease". Lancet **1**(8649): 1269.
- Schlossmacher, M. G., M. P. Frosch, W. P. Gai, M. Medina, N. Sharma, L. Forno, T. Ochiishi, H. Shimura, R. Sharon, N. Hattori, J. W. Langston, Y. Mizuno, B. T. Hyman, D. J. Selkoe, K. S. Kosik (2002). "Parkin localizes to the Lewy bodies of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies". Am J Pathol **160**(5): 1655-1667.

- Seidler, A., W. Hellenbrand, B. P. Robra, P. Vieregge, P. Nischan, J. Joerg, W. H. Oertel, G. Ulm, E. Schneider (1996). "Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease: a case-control study in Germany". Neurology **46**(5): 1275-1284.
- Shall, S., G. de Murcia (2000). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model?". Mutat Res **460**(1): 1-15.
- Sibayama-Imazu, T., Y. Fujisawa, Y. Masuda, T. Aiuchi, S. Nakajo, H. Itabe, K. Nakaya (2008). "Induction of apoptosis in PA-1 ovarian cancer cells by vitamin K2 is associated with an increase in the level of TR3/Nur77 and its accumulation in mitochondria and nuclei". J Cancer Res Clin Oncol **134**(7): 803-812.
- Singh, S., M. Dikshit (2007). "Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: involvement of nitric oxide". Brain Res Rev **54**(2): 233-250.
- Smith, S. (2001). "The world according to PARP". Trends Biochem Sci **26**(3): 174-179.
- Smulson, M. E., D. Pang, M. Jung, A. Dimtchev, S. Chasovskikh, A. Spoonde, C. Simbulan-Rosenthal, D. Rosenthal, A. Yakovlev, A. Dritschilo (1998). "Irreversible binding of poly(ADP)ribose polymerase cleavage product to DNA ends revealed by atomic force microscopy: possible role in apoptosis". Cancer Res **58**(16): 3495-3498.
- Smulson, M. E., C. M. Simbulan-Rosenthal, A. H. Boulares, A. Yakovlev, B. Stoica, S. Iyer, R. Luo, B. Haddad, Z. Q. Wang, T. Pang, M. Jung, A. Dritschilo, D. S. Rosenthal (2000). "Roles of poly(ADP-ribosylation) and PARP in apoptosis, DNA repair, genomic stability and functions of p53 and E2F-1". Adv Enzyme Regul **40**: 183-215.
- Spehlmann, R., S. M. Stahl (1976). "Dopamine acetylcholine imbalance in Parkinson's disease. Possible regenerative overgrowth of cholinergic axon terminals". Lancet **1**(7962): 724-726.
- Spillantini, M. G., M. Goedert (1998). "Tau protein pathology in neurodegenerative diseases". Trends Neurosci **21**(10): 428-433.
- Spillantini, M. G., M. Goedert, R. A. Crowther, J. R. Murrell, M. R. Farlow, B. Ghetti (1997). "Familial multiple system tauopathy with presenile dementia: a disease with abundant neuronal and glial tau filaments". Proc Natl Acad Sci USA **94**(8): 4113-4118.

- Spillantini, M. G., M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes, M. Goedert (1997). "Alpha-synuclein in Lewy bodies". Nature **388**(6645): 839-840.
- Stasik, I., A. Rapak, W. Kalas, E. Ziolo, L. Strzadala (2007). "Ionomycin-induced apoptosis of thymocytes is independent of Nur77 NBRE or NurRE binding, but is accompanied by Nur77 mitochondrial targeting". Biochim Biophys Acta **1773**(9): 1483-1490.
- Stephan, D. A., E. Gillanders, D. Vanderveen, D. Freas-Lutz, G. Wistow, A. D. Baxevanis, C. M. Robbins, A. VanAiken, M. I. Quesenberry, J. Bailey-Wilson, S. H. Juo, J. M. Trent, L. Smith, M. J. Brownstein (1999). "Progressive juvenile-onset punctate cataracts caused by mutation of the gammaD-crystallin gene". Proc Natl Acad Sci U S A **96**(3): 1008-1012.
- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B. E. Snow, G. M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D. R. Goodlett, R. Aebersold, D. P. Siderovski, J. M. Penninger, G. Kroemer (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor". Nature **397**(6718): 441-446.
- Susin, S. A., N. Zamzami, M. Castedo, T. Hirsch, P. Marchetti, A. Macho, E. Daugas, M. Geuskens, G. Kroemer (1996). "Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease". Journal of Experimental Medicine **184**(4): 1331-1341.
- Tatton, N. A. (2000). "Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease". Experimental Neurology **166**(1): 29-43.
- Tatton, N. A., S. J. Kish (1997). "In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining". Neuroscience **77**(4): 1037-1048.
- Tatton, N. A., A. Maclean-Fraser, W. G. Tatton, D. P. Perl, C. W. Olanow (1998). "A fluorescent double-labeling method to detect and confirm apoptotic nuclei in Parkinson's disease". Ann Neurol **44**(3 Suppl 1): S142-148.
- Tatton, W. G., R. Chalmers-Redman, D. Brown, N. Tatton (2003). "Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation". Ann Neurol **53** Suppl 3: S61-70; discussion S70-62.

- Thompson, J., A. Winoto (2008). "During negative selection, Nur77 family proteins translocate to mitochondria where they associate with Bcl-2 and expose its proapoptotic BH3 domain". J Exp Med **205**(5): 1029-1036.
- Toda, K., T. Harada (2010). "Prevalence, classification, and etiology of pain in Parkinson's disease: association between Parkinson's disease and fibromyalgia or chronic widespread pain". Tohoku J Exp Med **222**(1): 1-5.
- Tompkins, M. M., E. J. Basgall, E. Zamrini, W. D. Hill (1997). "Apoptotic-like changes in Lewy-body-associated disorders and normal aging in substantia nigral neurons". Am J Pathol **150**(1): 119-131.
- Tulin, A., A. Spradling (2003). "Chromatin loosening by poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) at Drosophila puff loci". Science **299**(5606): 560-562.
- Ullrich, O., A. Diestel, I. Y. Eyupoglu, R. Nitsch (2001). "Regulation of microglial expression of integrins by poly(ADP-ribose) polymerase-1". Nat Cell Biol **3**(12): 1035-1042.
- Valente, E. M., A. R. Bentivoglio, P. H. Dixon, A. Ferraris, T. Ialongo, M. Frontali, A. Albanese, N. W. Wood (2001). "Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36". Am J Hum Genet **68**(4): 895-900.
- Valente, E. M., F. Brancati, A. Ferraris, E. A. Graham, M. B. Davis, M. M. Bretelet, T. Gasser, V. Bonifati, A. R. Bentivoglio, G. De Michele, A. Durr, P. Cortelli, D. Wassilowsky, B. S. Harhangi, N. Rawal, V. Caputo, A. Filla, G. Meco, B. A. Oostra, A. Brice, A. Albanese, B. Dallapiccola, N. W. Wood (2002). "PARK6-linked parkinsonism occurs in several European families". Ann Neurol **51**(1): 14-18.
- Van Soom, C., I. Lerouge, J. Vanderleyden, T. Ruiz-Argueso, J. M. Palacios (1999). "Identification and characterization of hupT, a gene involved in negative regulation of hydrogen oxidation in Bradyrhizobium japonicum". J Bacteriol **181**(16): 5085-5089.
- Vekrellis, K., M. J. McCarthy, A. Watson, J. Whitfield, L. L. Rubin, J. Ham (1997). "Bax promotes neuronal cell death and is downregulated during the development of the nervous system". Development **124**(6): 1239-1249.
- Vila, M., D. Ramonet, C. Perier (2008). "Mitochondrial alterations in Parkinson's disease: new clues". Journal of Neurochemistry **107**(2): 317-328.

- Von Ahsen, O., N. J. Waterhouse, T. Kuwana, D. D. Newmeyer, D. R. Green (2000). "The 'harmless' release of cytochrome c". Cell Death Differ **7**(12): 1192-1199.
- Vousden, K. H., X. Lu (2002). "Live or let die: the cell's response to p53". Nat Rev Cancer **2**(8): 594-604.
- Wakabayashi, K., S. Engelender, M. Yoshimoto, S. Tsuji, C. A. Ross, H. Takahashi (2000). "Synphilin-1 is present in Lewy bodies in Parkinson's disease". Annals of Neurology **47**(4): 521-523.
- Wakabayashi, K., K. Tanji, F. Mori, H. Takahashi (2007). "The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates". Neuropathology **27**(5): 494-506.
- Walter, B. L., J. L. Vitek (2004). "Surgical treatment for Parkinson's disease". Lancet Neurol **3**(12): 719-728.
- Wansa, K. D., J. M. Harris, G. E. Muscat (2002). "The activation function-1 domain of Nur77/NR4A1 mediates trans-activation, cell specificity, and coactivator recruitment". J Biol Chem **277**(36): 33001-33011.
- Wansa, K. D., J. M. Harris, G. Yan, P. Ordentlich, G. E. Muscat (2003). "The AF-1 domain of the orphan nuclear receptor NOR-1 mediates trans-activation, coactivator recruitment, and activation by the purine anti-metabolite 6-mercaptopurine". J Biol Chem **278**(27): 24776-24790.
- Watanabe, M., M. Fukuda, M. Yoshida, M. Yanagida, E. Nishida (1999). "Involvement of CRM1, a nuclear export receptor, in mRNA export in mammalian cells and fission yeast". Genes Cells **4**(5): 291-297.
- Werme, M., L. Olson, S. Brene (2000). "NGFI-B and nor1 mRNAs are upregulated in brain reward pathways by drugs of abuse: different effects in Fischer and Lewis rats". Brain Res Mol Brain Res **76**(1): 18-24.
- Willis, S. N., J. M. Adams (2005). "Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis". Curr Opin Cell Biol **17**(6): 617-625.
- Wilson, A. J., D. Arango, J. M. Mariadason, B. G. Heerdt, L. H. Augenlicht (2003). "TR3/Nur77 in colon cancer cell apoptosis". Cancer Res **63**(17): 5401-5407.

- Wingate, A. D., D. G. Campbell, M. Pegg, J. S. Arthur (2006). "Nur77 is phosphorylated in cells by RSK in response to mitogenic stimulation". Biochem J **393**(Pt 3): 715-724.
- Winoto, A. (1997). "Genes involved in T-cell receptor-mediated apoptosis of thymocytes and T-cell hybridomas". Semin Immunol **9**(1): 51-58.
- Winoto, A., J. Thompson (2008). "During negative selection, Nur77 family proteins translocate to mitochondria where they associate with Bcl-2 and expose its proapoptotic BH3 domain". Journal of Experimental Medicine **205**(5): 1029-1036.
- Wolff, B., J. J. Sanglier, Y. Wang (1997). "Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA". Chem Biol **4**(2): 139-147.
- Woronicz, J. D., B. Calnan, V. Ngo, A. Winoto (1994). "Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas". Nature **367**(6460): 277-281.
- Wu, Q., S. Liu, X. F. Ye, Z. W. Huang, W. J. Su (2002). "Dual roles of Nur77 in selective regulation of apoptosis and cell cycle by TPA and ATRA in gastric cancer cells". Carcinogenesis **23**(10): 1583-1592.
- Wu, Y., Y. Shang, S. G. Sun, R. G. Liu, W. Q. Yang (2007). "Protective effect of erythropoietin against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurodegeneration in PC12 cells". Neuroscience bulletin **23**(3): 156-164.
- Wu, Y., M. Tada, K. Takahata, K. Tomizawa, H. Matsui (2007). "Inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids on apoptosis induced by etoposide, okadaic acid and AraC in Neuro2a cells". Acta medica Okayama **61**(3): 147-152.
- Xiao-Qing, T., Z. Jun-Li, C. Yu, F. Jian-Qiang, C. Pei-Xi (2005). "Hydrogen peroxide preconditioning protects PC12 cells against apoptosis induced by dopamine". Life sciences **78**(1): 61-66.
- Ye, H., C. Cande, N. C. Stephanou, S. Jiang, S. Gurbuxani, N. Larochette, E. Daugas, C. Garrido, G. Kroemer, H. Wu (2002). "DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor". Nat Struct Biol **9**(9): 680-684.

- Yoshida, M., M. Nishikawa, K. Nishi, K. Abe, S. Horinouchi, T. Beppu (1990). "Effects of leptomycin B on the cell cycle of fibroblasts and fission yeast cells". Experimental Cell Research **187**(1): 150-156.
- Zagnoli, F., F. Rouhart (2006). Maladie de Parkinson, Paris, France.
- Zetterstrom, R. H., L. Solomin, L. Jansson, B. J. Hoffer, L. Olson, T. Perlmann (1997). "Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice". Science **276**(5310): 248-250.
- Zetterstrom, R. H., R. Williams, T. Perlmann, L. Olson (1996). "Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system". Brain Res Mol Brain Res **41**(1-2): 111-120.
- Zhang, J., A. DeYoung, H. G. Kasler, N. H. Kabra, A. A. Kuang, G. Diehl, S. J. Sohn, C. Bishop, A. Winoto (1999). "Receptor-mediated apoptosis in T lymphocytes". Cold Spring Harb Symp Quant Biol **64**: 363-371.
- Zhang, X. K. (2002). "Vitamin A and apoptosis in prostate cancer". Endocr Relat Cancer **9**(2): 87-102.
- Zhang, X. K. (2007). "Targeting Nur77 translocation". Expert Opin Ther Targets **11**(1): 69-79.
- Zuccato, C., A. Ciammola, D. Rigamonti, B. R. Leavitt, D. Goffredo, L. Conti, M. E. MacDonald, R. M. Friedlander, V. Silani, M. R. Hayden, T. Timmusk, S. Sipione, E. Cattaneo (2001). "Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease". Science **293**(5529): 493-498.